

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-513986

(P2001-513986A)

(43) 公表日 平成13年9月11日 (2001.9.11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 9/107	4 B 0 2 4
A 6 1 K 9/107		39/12	4 B 0 6 4
39/12		39/145	4 B 0 6 5
39/145		39/39	4 C 0 7 6
39/39		A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 131 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-507701 (P2000-507701)  
 (86) (22) 出願日 平成10年8月17日 (1998.8.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成12年2月22日 (2000.2.22)  
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 8 / 0 5 2 8 5  
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 1 0 3 7 5  
 (87) 国際公開日 平成11年3月4日 (1999.3.4)  
 (31) 優先権主張番号 9 7 1 7 9 5 3 . 5  
 (32) 優先日 平成9年8月22日 (1997.8.22)  
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 スミスクライン ビーチャム バイオロジ  
 カルズ ソシエテ アノニム  
 ベルギー国 リキセンザール ビー 1330  
 ルー デ ランステイテュート 89  
 (72) 発明者 ブリュック, クローディーヌ  
 ベルギー国, ベー-1330 リクサンサール,  
 リュ ドウ ランステイテュ 89, スミス  
 クライン ビーチャム バイオロジカルズ  
 ソシエテ アノニム  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチン

## (57) 【要約】

本発明は、HPV抗原に対するTヘルパーエпитープを  
 供する免疫学的融合パートナーに連結した。ヒトパピロ  
 ーマウイルス (HPV) 融合タンパク質を供する。HP  
 V誘導性障害の治療又は予防に役立つワクチン製剤を供  
 する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫学的融合パートナーに連結したHPVからのE6もしくはE7タンパク質又はE6/E7融合タンパク質。

【請求項2】 前記融合パートナーが、次の群：ヘモフィルス・インフルエンゼBからのプロテインD又はそのフラグメント、ヘモフィルス・インフルエンゼBからのリボプロテインD又はそのフラグメント、インフルエンザウイルスからのNS1又はそのフラグメント、及び肺炎連鎖菌からのLYTA又はそのフラグメントから選択されることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 前記E6又はE7タンパク質が、HPV16又はHPV18から得られることを特徴とする請求項1又は2に記載のタンパク質。

【請求項4】 前記E7タンパク質が突然変異されていることを特徴とする請求項1、2又は3に記載のタンパク質。

【請求項5】 前記E6タンパク質が突然変異されていることを特徴とする請求項1、2又は3に記載のタンパク質。

【請求項6】 少なくとも4ヒスチジン残基のヒスチジntagを更に含む請求項1～5のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項7】 異種タンパク質、ヒスチジntag及びC-LYTAGを含む融合タンパク質。

【請求項8】 先の請求項のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA配列。

【請求項9】 請求項1～7のいずれかに記載のタンパク質と、医薬として許容される希釈剤又は賦形剤と、を含むワクチン。

【請求項10】 アジュバントを更に含む請求項9に記載のワクチン。

【請求項11】 前記タンパク質が水性エマルションビヒクル中の油内に供されることを特徴とする請求項9又は10に記載のワクチン。

【請求項12】 前記アジュバントが、3D-MPLもしくはQS21又はそれら両方を含むことを特徴とする請求項10又は11に記載のワクチン。

【請求項13】 更なるHPV抗原を含む請求項9～12のいずれかに記載のワクチン。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、ヒトパピローマ誘導性腫瘍の治療又は予防において利用性が見出される、Tヘルパーエпитープを供するタンパク質又はタンパク質の一部、及びヒトパピローマウイルスからの抗原を含む融合タンパク質に関する。特に、本発明は、ヘモフィルス・インフルエンゼBからのプロテインDに連結したHPV株16又は18からのE6又はE7を含む融合タンパク質に関する。

## 【0002】

パピローマウイルスは、極めて種特異的である小さな裸のDNA腫瘍ウイルス（7.9キロベース；二本鎖）である。70を超える個々のヒトパピローマウイルス（HPV）遺伝子型が記述されている。パピローマウイルスは起源の種（ヒト、ウシ等）及び同じ種からの他のパピローマウイルスとの遺伝子の関連性の程度に基づいて分類されている。HPVは皮膚又は粘膜表面に一般に特異的であり、異常又は腫瘍組織における各々まれな及び一般的な検出に基づいて“低い”及び“高い”危険性に広く分類されている。低い危険性のHPVは通常、数ヶ月又は数年間、持続する良性障害（疣贅又は乳頭腫）を引き起こす。HPVとヒト癌との間の最も強い陽性の関連性は、HPV16及び18並びに子宮頸癌の間に存在するものである。より低い頻度であるが、10を超える他のHPV型も子宮頸癌において見出されている。

## 【0003】

若いうちに活動している女性における生殖器HPV感染は一般的であり、ほとんどの個体が感染を取り除いているか、又は障害が進行しているなら、これらは回復する。感染した個体のサブセットのみが高グレード上皮内新形成に進行し、これらの進行のほんの少しだけが更に浸潤癌になる障害を有する。

HPV感染を導く分子の出来事は明確に確立されていない。ヒトパピローマウイルスを繁殖させる適当な試験管内システムの欠損がウイルスサイクルについての最も優れた情報への進行を害している。

## 【0004】

今日、異なる型のHPVが単離されており、細菌でのクローニングシステムに

【請求項14】 医薬に用いるための請求項9～13のいずれかに記載のワクチン。

【請求項15】 HPVにより誘導される良性又は悪性の腫瘍を患う被検体を免疫療法により治療するためのワクチンの製造のための請求項1～7のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項16】 HPVウイルス感染を予防するためのワクチンの製造のための請求項1～7のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項17】 請求項8に記載のDNA配列を含むベクター。

【請求項18】 請求項8に記載のDNA配列と、チオレドキシンをコードするDNA配列と、を含むベクター。

【請求項19】 請求項8に記載のDNA配列で形質転換された宿主。

【請求項20】 請求項17又は18に記載のベクターで形質転換された宿主。

【請求項21】 チオレドキシンをコードするDNA配列で更に形質転換された請求項19に記載の宿主。

【請求項22】 請求項1～7のいずれかに記載のタンパク質を生産するための方法であって、宿主細胞を請求項6に記載のDNA配列で形質転換し、該配列を発現させ、そして要求される産物を単離することを含む方法。

【請求項23】 請求項9～14のいずれかに記載のワクチンを生産するための方法であって、請求項1～7のいずれかに記載のタンパク質を、適切なアジュバント、希釈剤又は他の医薬として許容される賦形剤と混合することを含む方法。

より、及びより最近PCR増幅によりキャラクタライズされている。HPVゲノムの分子機構は十分にキャラクタライズされたウシパピローマウイルス1型（BPV1）のものと比較に基づいて定義されている。

小さな変異があるが、記述されている全てのHPVは少なくとも7の早期遺伝子E1～E7及び2つの後期遺伝子L1及びL2を有する。更に、上流調節領域は、HPVゲノムのほとんどの転写による出来事を制御するようである調節配列を有する。

## 【0005】

E1及びE2遺伝子は、各々ウイルス複製及び転写制御に関連し、ウイルス組込みにより破壊される傾向がある。E6及びE7はウイルス形質転換に関連する。E5もこの過程に関係している。

HPV16及び18のような子宮頸癌に関連するHPVにおいてオンコジンの過程はウイルスDNAの組込み後に開始する。その組込みはキャプシドタンパク質L1及びL2をコードする遺伝子を不活性化させ、E2レプレッサー機能の喪失は2つの早期タンパク質E6及びE7の連続的な過剰発現を配置するE6/E7オープン読み枠の統制排除を導き、それは正常な細胞の分化を次第に失わせ、癌を進展させるであろう。E6及びE7は、各々、網膜芽腫遺伝子産物である主要腫瘍抑制タンパク質p53及びpRBを不活性化することにより正常な細胞周期を克服する。

## 【0006】

子宮頸の癌は女性において一般的であり、前癌中間段階を経て浸潤癌に進展し、頻繁に死を導く。その病気の中間段階は子宮頸上皮内新形成として知られており、激しさの増加と共にI～III段階である（CIN I～III）。

臨床的に、女性の肛門性器のHPV感染は子宮頸扁平コンジロームとして顕在化し、その特徴は子宮頸扁平上皮の表面及び中間細胞に主に作用する空胞細胞症である。

## 【0007】

ウイルスの細胞病理効果の結果であるコイロサイト（koilocytes）は核周囲の透明な光輪を伴う多核化細胞として現れる。その上皮はその障害のいば状の外観

の原因である異常な角質化を伴って厚くなる。

このような扁平コンジロームは、HPV16又は18血清型について陽性である場合、浸潤癌の前駆障害とそれら自体考えられる子宮頸上皮内新形成(CIN)及び上皮内癌(カルチノーマ・イン・サイチュウ)に対する進行に対する高い危険性の因子である。

#### 【0008】

発癌性HPV感染の自然の経過は、3つの連続段階を示す。即ち、

(1)潜伏感染期、

(2)コイロサイトの発生に相当する、完全なビリオンの生産を伴う核内ウイルス複製の段階。この段階においてHPVは、E2、E5、E6、E7、L1及びL2を含むその十分な範囲のタンパク質を生産している。

#### 【0009】

(3)悪性腫瘍形成の初まりを誘発し、コイロサイトの次第の消失を伴う、CINII及びCINIII/CISに対応する、細胞ゲノムへのウイルス組込みの段階。この段階において、E2の発現は下降抑制され、E6及びE7の発現は増強される。CINII/III及びCINIII/子宮頸癌の間で、ウイルスDNAは基底細胞内でエピソームであったのがE6及びE7遺伝子のみ(腫瘍細胞)の組込みに変化する。全ての子宮頸癌の85%はHPV16血清型に最も支配的に関係する扁平上皮細胞癌である。10%及び5%が各々腺癌及び腺扁平上皮細胞癌であり、両方の型は主に、HPV18血清型に関連する。しかしながら他の発癌性HPVも存在する。

#### 【0010】

国際特許出願WO96/19496は、ヒトパピローマウイルスE6及びE7タンパク質の変異体、特にE6及びE7タンパク質中に欠失があるE6/E7の融合タンパク質を開示する。これらの欠失融合タンパク質は免疫原性と呼ばれる。

本発明は、T細胞エピトープを有する免疫学的融合パートナーに連結したE6もしくはE7又はE6/E7融合タンパク質を含む組成物を提供する。

#### 【0011】

。

#### 【0014】

本発明のタンパク質は、好ましい大腸菌内で発現される。好ましい実施形態においてタンパク質は5~9、好ましくは6のヒスチジン残基を含むヒスチジン・テールと共に発現される。これらは精製を助けることに有利である。

タンパク質E7は、好ましい実施形態において、r b部位(網膜芽腫産物)のための結合を減少させるための変異を有する。HPV16E7のための好ましい変異は、Cys24をグリシンで、グルタミン酸26をグルタミンで置換することに関する。好ましい実施形態において、E7タンパク質はこれらの変異の両方を含む。

#### 【0015】

HPV18E7のための好ましい変異はCys27をグリシンで及び/又はグルタミン酸29をグルタミンで置換することに関する。また、好ましくは、両方の変異が存在する。

単一又は二重変異も、いずれかの潜在的な形質転換能力を除去するためE6のp53領域に導入することができる。

#### 【0016】

本発明の更なる実施形態において、免疫学的融合パートナーに連結したHPVからのE6E7融合タンパク質を提供する。好ましい免疫学的融合パートナーはプロテインD、より好ましくはプロテインDの最初の1/3である。

本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAも提供する。このような配列は適切な発現ベクター内に挿入し、適切な宿主内で発現させることができる。

#### 【0017】

本発明のタンパク質をコードするDNA配列は、標準的なDNA合成技術を用いて例えばD.M.Robertsら(Biochemistry 1985, 24, 5090~5098)により記載される酵素連結により、化学合成により、試験管内酵素重合化により、もしくは例えば熱安定ポリメラーゼを利用するPCR技術により、又はこれらの技術の組合せにより合成することができる。

#### 【0018】

本発明の好ましい形態において、免疫学的融合パートナーは、ヘモフィルス・インフルエンゼBのプロテインDから得られる。好ましくは、プロテインD誘導体は、そのタンパク質の最初の約1/3を含み、特におよそ最初のN末端100~110アミノ酸を含む。プロテインDは、脂質化され得る(Lipo Protein D)。他の免疫学的融合パートナーには、インフルエンザウイルスからの非構造タンパク質、NS1(ヘマグルチニン)がある。典型的にはN末端81アミノ酸が利用される。但し、それらがTヘルパーエピトープを含むなら、異なるフラグメントを用いることができる。

#### 【0012】

他の実施形態において、免疫学的融合パートナーはLYTAとして知られるタンパク質である。好ましくは、その分子のC末端タンパク質が用いられる。Lytaは、N-アセチル-L-アラニンアミダーゼ、(Lyta遺伝子によりコードされる(Gene, 43 (1986) ページ265~272))アミダーゼLYTA、ペプチドグリカン骨格中の特定の結合を特異的に分解するアトリシシンを合成するストレプトコッカス・ニューモニア(Streptococcus pneumoniae)から得られる。LYTAタンパク質のC末端ドメインはコリン又は特定のコリンアナログ、例えばDEAEに対するアフィニティーの原因である。この特性は、融合タンパク質の発現のために役立つプラスミドを発現する大腸菌C-LYTAの開発のために利用されている。そのアミノ末端にC-LYTAフラグメントを含むハイブリッドタンパク質の精製は開示されている(Biotechnology: 10, (1992) ページ795~798)。本明細書に用いる場合、好ましい実施形態は残基178で始まるC末端内に見出されるLyta分子の反復部分を利用する。特に好ましい形態は残基188~305を組み込む。

#### 【0013】

従って、本発明は、好ましい実施形態において、プロテインD-HPV16からのE6、プロテインD-HPV16からのE7、プロテインD-HPV18からのE7、プロテインD-HPV18からのE6並びにプロテインD-HPV16及び18の両方からのE6/E7を含む融合タンパク質を提供する。他のHPVサブタイプからの他のE6及びE7タンパク質も利用できることが認められよう

DNAの酵素重合は一般に50 $\mu$ l又はそれ未満の容量で、必要に応じて10~37℃の温度でヌクレオシドトリホスフェートdATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含む適切な緩衝液中でDNAポリメラーゼ、例えばDNAポリメラーゼI(クレノウフラグメント)を用いて行うことができる。DNAフラグメントの酵素連結は、適切な緩衝液、例えば0.05M Tris (pH7.4)、0.01M MgCl<sub>2</sub>、0.01Mジチオトレイトール、1mMスベルミン、1mM ATP及び0.1mg/mlウシ血清アルブミン中で、4℃~環境温度の温度で、一般に50ml又はそれ未満の容量で、T4DNAリガーゼのようなDNAリガーゼを用いて行うことができる。DNAポリマー又はフラグメントの化学合成は、慣用的なホスホトリエステル、ホスファイト又はホスホルアミジト化学により、固相技術、例えば'Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments - A Laboratory Manual' (ed. H.G.Gassen and A.Lang), Verlag Chemie, Weinheim (1982)、又は他の科学文献、例えばM.J.Gait, H.W.D.Matthes, M.Singh, B.S.Sproat, and R.C.Titmas, Nucleic Acids Research, 1982, 10, 6243; B.S.Sproat, and W.Bannwarth, Tetrahedron Letters, 1983, 24, 5771; M.D.Matteucci and M.H.Caruthers, Tetrahedron Letters, 1980, 21, 719; M.D.Matteucci and M.H.Caruthers, Journal of the American Chemical Society, 1981, 103, 3185; S.P.Adams et al., Journal of the American Chemical Society, 1983, 105, 661; N.D.Sinha, J.Biernat, J.McMannus, and H.Koester, Nucleic Acids Research, 1984, 12, 4539; and H.W.D.Matthes et al., EMBO Journal, 1984, 3, 801に記載されるものを用いて行うことができる。

#### 【0019】

本発明の方法は、慣用的な組換え技術、例えばManiatisら(Molecular Cloning - A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor, 1982~1989)に記載されるものにより行うことができる。

特に、その方法は、次のステップ:

i) そのタンパク質又はその免疫学的誘導体をコードするヌクレオチド配列を含むDNAポリマーを宿主細胞内で発現することができる複製可能又は組込み可能発現ベクターを調製し;

- ii) 該ベクターで宿主細胞を形質転換し;
  - iii) その形質転換された宿主細胞を、前記DNAポリマーの発現を許容し前記タンパク質を作り出す条件下で培養し;そして
  - iv) 前記タンパク質を回収する
- ことを含む得る。

## 【0020】

用語“形質転換”は、外来DNAの宿主細胞への導入を意味するとして本明細書に用いる。これは、例えば形質転換、トランスフェクション又は適切なプラスミドもしくはウイルスベクターの感染により、例えばGenetic Engineering; Eds., S.M.Kingsman及びA.J.Kingsman; Blackwell Scientific Publications; Oxford, England, 1988に記載されるような慣用的な技術を用いて達成することができる。用語“形質転換”又は“形質転換体”は、以後、関心の外来遺伝子を含み、それを発現する生じた宿主細胞に適用するであろう。

## 【0021】

好ましくは、本発明の組換え抗原は大腸菌内で発現される。その発現戦略は、T細胞ヘルパーエпитープを供する免疫学的融合パートナーであるヘモフィスインフルエンゼBからのDタンパク質の1/3-N末端部分へのE7、E6又はE6/E7融合物の融合を含む。アフィニティーポリヒスチジン・テールは、融合タンパク質のカルボキシル末端において工作され、簡単な精製を許容する。このような組換え抗原は不溶性タンパク質として大腸菌内で過剰発現される。

## 【0022】

好ましくは、本発明のタンパク質は、トランスでチオレドキシンと同時に発現される。トランス対シスのチオレドキシンの同時発現が、プロテアーゼを必要とすることなく、チオレドキシンを含まない抗原を維持するために好ましい。チオレドキシ同時発現は、本発明のタンパク質の可溶化を容易にする。チオレドキシ同時発現は、タンパク質精製収率、精製されたタンパク質の溶解度及び質に大きな影響を与える。

## 【0023】

DNAポリマーの発現を許容する条件下での形質転換された宿主細胞の培養は、便利には、例えば上述のManiatisら及び“DNA Cloning”に記載される通り、行われる。これにより、好ましくは、その細胞には栄養素が補給され、50℃未満の温度で培養される。

産物は、宿主細胞に従って慣用的な方法により回収される。これにより、宿主細胞が細菌、例えば大腸菌である場合、それは物理的、化学的又は酵素的に溶解することができ、そのタンパク質産物は生じたライゼートから単離することができる。宿主細胞が哺乳動物である場合、その産物は栄養培地から又は無細胞抽出物から単離することができる。慣用的なタンパク質単離技術には、選択的沈殿、吸着クロマトグラフィー、及びモノクローナル抗体アフィニティークラムを含むアフィニティークロマトグラフィーがある。

## 【0028】

本発明のタンパク質をヒスチジンテール(Hisタグ)と共に発現させる場合、そのタンパク質はイオン金属アフィニティークラム(IMAC)カラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーにより容易に精製することができる。

高度に精製されたタンパク質を生産するために、IMACカラムの前又は後のいずれかに、第2のクロマトグラフーステップ、例えばQ-セファロースを利用することができる。免疫学的融合パートナーがC-LYT Aである場合、この産物を精製するためにコリン及び/又はDEAEについてのC-LYT Aのアフィニティーを利用することができる。C-LYT A及びHisタグの両方を含む産物は、示差アフィニティークロマトグラフィーに関する2ステッププロセスにおいて容易かつ効率よく精製することができる。一方のステップはHisタグのIMACカラムへのアフィニティーに関し、他方はコリン又はDEAEについてのLYT AのC末端ドメインのアフィニティーに関する。

## 【0029】

C-LYT A及びヒスチジンタグの両方を含むタンパク質は新規であり、従って本発明の一態様を形成する。これらは、簡単な2ステップ示差アフィニティー手順により、高レベル(80%超、好ましくは90%超)に精製することができる。

その発現ベクターは新規でありこれも本発明の一部を形成する。

複製可能発現ベクターは、本発明に従って、宿主細胞に適合するベクターを開裂して完全なレプリコンを含む直鎖DNAセグメントを供し、そしてその直鎖セグメントを、その直鎖セグメントと一緒に要求される産物をコードする1又は複数のDNA分子、例えば本発明のタンパク質をコードするDNAポリマー又はその誘導体と、連結条件下で組み合わせることにより調製することができる。

## 【0024】

これにより、そのDNAポリマーは、必要に応じてベクターの作製の間に前もって形成し又は形成することができる。

ベクターの選択は、原核生物でも真核生物でもよいが好ましくは大腸菌である宿主細胞により部分的に決定されよう。適切なベクターには、プラスミド、バクテリオファージ、コスミド及び組換えウイルスがある。

## 【0025】

複製可能発現ベクターの調製は、便利にはDNAの制限、重合及び連結のための適切な酵素と共に、例えば上述のManiatisらに記載される手順により行うことができる。

組換え宿主細胞は、本発明に従って、宿主細胞を本発明の複製可能発現ベクターで形質転換条件下で形質転換することにより調製される。適切な形質転換条件は慣用的であり、例えば上述のManiatisら、又は“DNA Cloning” Vol.1, D.M.Glover ed., IRL Press Ltd, 1985に記載される。

## 【0026】

形質転換条件は宿主細胞により決定される。これにより、細菌宿主、例えば大腸菌は、CaCl<sub>2</sub>の溶液(Cohenら、Proc.Nat.Acad.Sci, 1973, 69, 2110)で、又はRbCl, MnCl<sub>2</sub>、酢酸カリウム及びグリセロールの混合物を含む溶液で、次に3-(N-モルホリノ)ープロパンスルホン酸、RbCl及びグリセロールで処理することができる。培養中の哺乳動物細胞は、細胞へのベクターDNAのカルシウム共沈殿により形質転換することができる。本発明は、本発明の複製可能発現ベクターで形質転換された宿主細胞にも広げられる。

## 【0027】

本発明のタンパク質は、SDS-PAGEにより可視化して、好ましくは少くとも80%純度、より好ましくは90%純度で供される。そのタンパク質は還元条件下でSDS-PAGEにより分析した場合、主要単一バンドを供し、ウエスタン・ブロット分析は、5%未満の宿主細胞タンパク質汚染を示す。

## 【0030】

本発明は、医薬として許容される賦形剤中に本発明のタンパク質を含む医薬組成物も供する。好ましいワクチン組成物は、少くとも、プロテインD-HPV16からのE7と一緒に、プロテインD-HPV16からのE6又はその誘導体を含む。あるいは、E6及びE7は、単一分子、好ましくはプロテインD E6/E7融合物において供することができる。このようなワクチンは、任意に、HPV18からのE6及びE7タンパク質のいずれか又は両方を、好ましくはプロテインD-E6もしくはプロテインD-E7融合タンパク質又はプロテインD E6/E7融合タンパク質の形態で含む。本発明のワクチンは、HPV16又は18からの他のHPV抗原を含み得る。特に、本ワクチンは、L1又はL2抗原モノマーを含み得る。あるいは、このようなL1及びL2抗原は、ウイルス様粒子として一緒に供しても、L1単独タンパク質をウイルス様粒子又はキャプソメア構造として供してもよい。このような抗原、ウイルス様粒子及びキャプソメアはそれぞれ周知である。例えばWP94/00152, WO94/20137, WO94/05792、及びWO93/02184を参照のこと。付加的な早期タンパク質、例えばE2又は好ましくはE5を含めることができる。本発明のワクチンは、他のHPV株から、好ましくは株HPV6, 11, HPV31又は33からの抗原を更に含み得る。

## 【0031】

ワクチン調製は、一般に、Vaccine Design-The Subunit and adjuvant approach (Ed. Powell及びNewman) Pharmaceutical Biotechnology Vol.6 Plenum Press 1995に記載される。リボソーム内への被包は、Fullerton、米国特許4,235,875により記載される。

本発明のタンパク質は、好ましくは、本発明のワクチン製剤において補助される。適切なアジュバントは、アルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウムゲル及

びリン酸アルミニウムを含むが、カルシウム、鉄もしくは亜鉛の塩であっても、又はアシル化チロシン又はアシル化糖、カチオン又はアニオン誘導化ポリサッカライド又はポリホスホファゼンの不溶性懸濁液であってもよい。

#### 【0032】

本発明の製剤において、アジュバント組成物が優先的なTH1応答を誘導することが好ましい。適切なアジュバントシステムは、例えばモノホスホリル脂質A、好ましくは3'-de-O-アシル化モノホスホリル脂質A(3D-MPL)の、アルミニウム塩との組合せがある。

増強されたシステムは、モノホスホリル脂質Aとサポニン誘導体との組合せ、特にWO94/00154に開示されるようなQS21と3D-MPLとの組合せ、又はQS21がWO96/33739に開示されるようにコレステロールで消光されているより少ない反応性の組成物に関する。

#### 【0033】

水中油エマルジョン中のQS21、3D-MPL及びトコフェロールに関する特に潜在的なアジュバント製剤はWO95/17210に記載され、それは好ましい製剤である。

従って、本発明の一実施形態において、モノホスホリル脂質A又はその誘導体で補助された、プロテインD(又はその誘導体)-E6又はプロテインD(又はその誘導体)-E7を含むワクチンを供する。

#### 【0034】

好ましくは、本ワクチンは、サポニン、より好ましくはQS21を更に含む。

好ましくは本製剤は、水中油エマルジョン及びトコフェロールを更に含む。本発明は、医家として許容される賦形剤、例えば3D-MPLと一緒に本発明のタンパク質を混合することを含むワクチン製剤を生産するための方法も供する。

本発明は、以下の例を引用することにより更に記述されよう。

#### 【0035】

実施例I：融合タンパク質-D1/3-E7-His(HPV16)を発現する大腸菌株の作製

##### 1) 発現プラスミドの作製

ci., 82: 88) に導入した。

##### 3) 細菌株の増殖及び誘導-Protein-D1/3-E7-Hisの発現

プラスミドpRIT14501で形質転換したAR58の細胞を、30℃で50µg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39℃にシフトしてλレプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E7-Hisの合成に向かわせた。39℃でのインキュベーションを4時間、続けた。細菌をベレット化し、-20℃で保存した。

#### 【0039】

実施例II：融合タンパク質D1/3-E7-His(HPV16)のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁する。細菌を、20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する(3回)。その抽出液を4℃で30分、16,000gで遠心する。

#### 【0040】

上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロッティングにより分析した。ベレット画分中にある約33kDaの主要バンドをクーマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したNi-NTAコンジュゲート(Qiagen cat. no. 34510)によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルはクーマシー染色したSDS-ポリアクリルアミドゲル上に示される通り、全タンパク質の約5%を示す。

#### 【0041】

実施例III：タンパク質-D1/3-E7-His(HPV16)精製

タンパク質-D1/3-E7-Hisを発現する細菌の1リッター培養物を11,300gで30分、4℃で遠心し、細胞ベレットを更なる処理まで-80℃に維持する。75ml PBS緩衝液中への再度の懸濁の後、大腸菌細胞を20,000psiでフレンチ圧力細胞プレス(SLM Aminco(登録商標))で破壊する。溶解した細胞を30分、17,000gでの遠心によりベレット状に

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3(=pRIT14589)はインフルエンザからのNS1コーディング領域のコンドン4~81がヘモフィルスインフルエンゼ株772、バイオタイプ2(H Jansonら、1991, Infection and Immunity, Jan. p119-125)の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に相当するコンドンにより置換されている(WO97/01640として公開されたUK特許出願no. 9513261, 9に記載される)pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域(6His)がある。

#### 【0036】

b) HPVゲノムE6及びE7配列タイプHPV16(Dortら、Virology 1985, 145, p.181~185を参照のこと)を、(Deutsches Krebsforschungszentrum(DKFZ), Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomaviruses-D69120-Heidelbergから得た)pBR322にクローン化したHPV16全長ゲノムから増幅し、pUC19にサブクローニングしてTCA301(=pRIT14462)を供した。

#### 【0037】

プラスミドTCA308(=pRIT14501)の作製：融合タンパク質-D1/3-E7-Hisを発現するプラスミド

E7のアミノ酸1-198に相当するヌクレオチド配列をpRIT14462から増幅する。そのポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE7配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG MCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA308(=pRIT14501)を供した。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に改変が形成されていないことを確認した。その融合タンパク質-D1/3-E7-His(HPV16)についての配列を図1に記載する。

#### 【0038】

##### 2) AR58株の形質転換

プラスミドpRIT14501をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失λリゾゲンを含む大腸菌AR58(Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.S

する。タンパク質-D1/3-E7-Hisを含むベレットを30mlの2M NaCl、50mM Phosphate pH7.5で1回、次に30mlの50mM Phosphate pH7.5で2回、洗う。

#### 【0042】

RTで30mlの8M尿素、50mMホスフェートpH7.5中での2時間のインキュベーションの後、ホスフェートpH7.5タンパク質を溶かす。4℃で17,000gでの15分の遠心により細胞デブリスを除去する。タンパク質精製をRTで行い、溶解したタンパク質15mlを、8M尿素、50mMホスフェートpH7.5で予め平衡化した5mM Ni2+NTA(Qiagen)樹脂(PharmaciaカラムXK 16/20)に、0.2ml/分の流速で適用する。280nmの吸光度が基底ラインに達するまで同じ緩衝液で洗う。そのタンパク質を8M尿素、50mMホスフェートpH7.5中の0-600mMイミダゾール勾配で溶出する。これらの2つの最後のステップの流速を1ml/分ににする。溶出した画分をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により及びウエスタン・ブロッティングにより分析する。クーマシーブルー染色により、ポリクローナル抗プロテインDにより又はモノクローナル抗E7抗体により可視化したProt-D1/3-E7-Hisは約32kDaの主要単一バンドを示し、95%純度タンパク質として評価される。ポリクローナル抗大腸菌タンパク質抗体で追跡した大腸菌汚染物は観察されない。

#### 【0043】

尿素を除去するために、1,33mg/mlの精製抗原(Bradford)9mlをRTで一晩、PBS緩衝液3リッターに対して透析し、次に新しいPBS緩衝液に対して4時間、透析する。80%の無尿素タンパク質を可溶性タンパク質として回収する。汚染しているエンドトキシンを除去するために、6mlの透析したタンパク質を1mlのAffiprepポリミキシングゲル(Biorad)と、3時間、4℃で、静かに攪拌しながらインキュベートした。500µlのAffiprepポリミキシング樹脂との第2のインキュベーションを行ってエンドトキシンレベルを8.8EU/µgタンパク質に最小化する。0.22µmフィルター装置(Milllex 0.22 GV, Millipore)での滅菌ろ過の後、0.665mg/mlのprot-D1/

3-E7-Hisを安定性のためにアッセイする。SDS PAGE分析は、-20℃、4℃、RT\*又は37℃における7日のインキュベーションの後にタンパク質の進化を示さなかった。

#### 【0044】

実施例IV：融合タンパク質-D1/3-E6-His/HPV16を発現する大腸菌株の作製

##### 1. 発現プラスミドの作製

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) は、インフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4-81がヘモフィルス・インフルエンザ株772、バイオタイプ2 (H.Jansonら、1991, *Infection and Immunity*, Jan. p.119~125) の成熟タンパク質の残基Ser20→Thr127に相当するコドンにより置換されている(WO97/01640に記載される)pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテール(6His)のためのコドン領域がある。このプラスミドを用いて融合タンパク質D1/3-E6-Hisを発現させる。

#### 【0045】

b) HPVゲノムE6及びE7配列型HPV16 (Seedorfら、*Virology* 1985, 145, p181~185) を、(Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomavirusesから得た)pBR322にクローン化したHPV16全長ゲノムから増幅した。

c) D69120-HeidelbergをpUC19にサブクローン化してTCA301 (=pRIT14462) を供する。

#### 【0046】

プラスミドTCA307 (=pRIT14497) の作製：融合タンパク質-D1/3-E6-His/HPV16を発現するプラスミド

E6タンパク質のアミノ酸1→151に相当するヌクレオチド配列をpRIT14462から増幅した。ポリメラーゼ連鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE6配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG MCS Prot

TA (Qiagen cat no 34510) によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約5%を示す。

#### 【0050】

##### 5. チオレドキシンとの同時発現

HPV18からのprot D1/3 E7 Hisの発現(実施例III)と同様に、大腸菌株AR58をチオレドキシン及びプロテインD1/3 E7 His (HPV16) で形質転換した。

##### 実施例V：Prot D1/3 E6 His (HPV16) の精製

HPV-16 Prot D1/3 E6組換え抗原を大腸菌 (AR58) 内で発現させた。発現戦略は、T細胞ヘルパーエビトープを供する免疫学的融合パートナーであるヘモフィルス・インフルエンザからのプロテインDの1/3-N末端部分へのE6の融合を含んだ。アフィニティポリヒスチジンテールをその融合タンパク質のカルボキシ末端に工作した。その組換え抗原は不溶性タンパク質として大腸菌内で過剰発現された。

#### 【0051】

抗原の可溶化は変性剤を必要とした。変性剤の欠如下で、Prot D1/3-E6-Hisは中性pHで沈殿した。可溶性の問題を回避するために、これらのタンパク質の、ホールディングパートナーであるトランスのチオレドキシン (Thioredoxin in Trans) (TIT) との同時発現を行った。

細菌の発現はLB培地中で、30℃で0.05mg/mlのカナマイシン及びチオレドキシンを同時発現する場合、0.2mg/mlのアムピシリンの存在下で行う。組換えタンパク質発現は、細胞光学密度 (OD<sub>600nm</sub>) が0.4に達した時に細胞を42℃に移すことにより熱的誘導される。タンパク質発現は4時間、維持される。精製は以下のプロトコルに従って行った。

細胞培養ベレット 600D<sub>600</sub>  
1mM pefabloc、2M NaCl、PBS pH 7.4 (Buffer A)  
フレンチプレス粉砕機 3回  
20,000psi

D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA307 (=pRIT14497) を作った (図2を参照)。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ連鎖反応の間に改変が形成されていないことを確認した。融合タンパク質-D1/3-E6-Hisのためのコーディング配列を図3に記載する。

#### 【0047】

##### 2. AR58株の形質転換

プラスミドpRIT14497をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失メリソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 82: 88) に導入した。

##### 3. 細菌株の増殖及び誘導-Prot-D1/3-E6-Hisの発現

プラスミドpRIT14497で形質転換したAR58の細胞を、30℃で50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39℃にシフトしてλレプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E6-Hisの合成に向かわせた。39℃でのインキュベーションを4時間、続けた。細菌をベレット化し、-20℃で保存した。

#### 【0048】

4. 融合タンパク質D1/3-E6-His (HPV16) のキャラクタリゼーション

##### 抽出物の調製

凍結した細胞を解冻し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁した。細胞を20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する(3回)。その抽出物を16,000gで30分、4℃で遠心する。

#### 【0049】

SDS-ポリアクリルアミドゲル及びウエスタンブロットでの分析

上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートをSDS-ポリアクリルアミドゲル及びウエスタン・ブロットングにより分析した。

そのベレット画分にある約32kDaの主要バンドをクマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したNi-N

遠心	17,000g 30分、4℃
ベレット洗浄	2M NaCl、PBS pH7.4 (Buffer B) ×1
	PBS pH7.4 (Buffer C) ×2
遠心	17,000g 30分、4℃
ベレット可溶化	6M塩化グアニジン、20mM PO <sub>4</sub> 、pH7.0 (Buffer D) 一晚、4℃
遠心	17,000g 30分、4℃
IMAC上の上清	平衡化： 6M塩化グアニジン、20mM PO <sub>4</sub> 、pH7.0 (Buffer D) 溶出：イミダゾールステップ (0.025M, 0.1M, 0.5M) 8M尿素、20mM PO <sub>4</sub> 、pH7.0中
Affiprepポリミキシン	8M尿素、20mM PO <sub>4</sub> 、pH7.0 (Buffer E) 2h RT*
透析	4M尿素、0.5Mアルギニン、150mM NaCl、10mM PO <sub>4</sub> 、pH6.8 (Buffer I) 2M尿素、0.5Mアルギニン、150mM NaCl、10mM PO <sub>4</sub> pH6.8 (Buffer J) 0M尿素、0.5Mアルギニン、150mM NaCl、10mM PO <sub>4</sub> pH6.8 (Buffer K)

細胞は、フレンチプレス細胞装置を用いて高圧ホモジェニゼーションにより効率よく破壊される。抗原は高濃度のタンパク質変性剤で抽出する。この最初のステップは細胞壁を破壊し、その細菌の不溶性画分から抗原を抽出する。以下の精製を4リッター培養物で行った。

#### 【0052】

## 緩衝液

- A. PBS/2M NaCl/1mM Pefabloc  
 B. PBS/2M NaCl  
 C. PBS:137mM NaCl、2.7mM KCl、8.1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7.4  
 D. 6M塩化グアニジウム、20mM PO<sub>4</sub> (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O)/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3H<sub>2</sub>O)) pH7.0

出発材料は各々400ml培養物の10のフラスコである。

## 【0053】

細胞ペーストをBuffer A (この場合、240mlのBuffer A) 中600D<sub>600</sub>に懸濁し、次にフレンチプレス粉砕機に、3回通して細胞を溶解する。溶解した細胞を15,000gで4℃で30分ベレット状にする。粗換えタンパク質を含む細胞の細胞ベレットを240ml Buffer Bで1回、240ml Buffer Cで2回、洗う。

## 【0054】

Prot D E6-His (TIT) を回転ホイール上で4℃で一晩、240ml Buffer Dにより可溶化する。細胞デブリを4℃で15,000gで30分、ベレット状にする。上清(230ml)を-20℃で保存する。次にその材料をIMACクロマトグラフィーにかける。

キレート化リガンドNTA (ニトリロトリ酢酸) をアガロース支持体 (Qiagen) に結合させる。NTAリガンドにニッケル金属イオンを満す。それは、そのニッケルの6の配位部位のうち4つを介して相互作用する。ニッケルの残りの2つの配位部位は6×His標識化タンパク質のヒスチジン残基と強力に相互作用する。Ni-NTAと結合しその標識化抗原に置きかわるイミダゾールとの競合により溶出を行う。

## 【0055】

Ni-NTA Agarose Qiagen (カタログ番号:30250) を用いた。

## 溶液

D: 6M塩化グアニジン、20mM PO<sub>4</sub> (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O)/K<sub>2</sub>

ミキシンBは高い能力及び選択性でエンドトキシン分子に結合する。

## 【0059】

## 溶液

E: 8M尿素、20mM PO<sub>4</sub> (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O)/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3H<sub>2</sub>O))、pH7.0 (非発熱性)。

0.5M NaOH

脱イオン非発熱性水

## 手順

1) Affi-Prep (登録商標) ポリミキシン樹脂を10容量の0.1M NaOH、次に10容量の無発熱物質水で洗う。

## 【0060】

2) 樹脂を10容量のBuffer Eで平衡化する。

3) 15ml (半分をブール) のIMAC溶出サンプルを3mlのAffi-Prep (登録商標) ポリミキシン樹脂と、バッチ・モードでインキュベートする。

4) インキュベーションを、回転ホイール上で4℃で室温又はO/Nで4時間、追跡する。

## 【0061】

5) サンプルを2000gで10分、遠心する (Beckman GS-6R)。

6) 抗原を含む上清を収集し、エンドトキシン及びタンパク質アッセイにかけ

る。

7) 樹脂を捨てる。

小分子は半透膜を介して拡散するが、大きな分子は保持される。透析の過程はその膜の2つの側上の溶質の濃度の差により駆動される。各々の側の緩衝組成物が平衡になるまで、新しい溶液を導入する。

## 【0062】

## 緩衝液

上: 4M尿素、0.5Mアルギニン、0.15M NaCl、10mM PO<sub>4</sub> (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O)/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3H<sub>2</sub>O)) pH6.8

下: 2M尿素、0.5Mアルギニン、0.15M NaCl、10mM PO<sub>4</sub> (

HPO<sub>4</sub> (3H<sub>2</sub>O))、pH7.0

E: 8M尿素、20mM PO<sub>4</sub> (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O)/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3H<sub>2</sub>O))、pH7.0

F: E+0.025Mイミダゾール

G: E+0.1Mイミダゾール

H: E+0.5Mイミダゾール

0.5M NaOH

脱イオン水

0.02% NaN<sub>3</sub>

## 精製

a) 樹脂 (15ml樹脂/230mlサンプル) を充填し、15cmh<sup>-1</sup>で10カラム容量 (C.V.) のBuffer Dで平衡化する。

## 【0056】

b) 可溶化画分からの上清を15cmh<sup>-1</sup>でそのカラムに注入する。

c) OD28nmがベースラインに戻るまでカラムをBuffer Dで15cmh<sup>-1</sup>で洗う。

d) カラムを15cmh<sup>-1</sup>で2CVのBuffer Eで洗う。その洗浄画分を回収する。

## 【0057】

e) カラムを最初に5CVのBuffer Fで溶出する。25kD主要汚染物を除去する。

f) 次にカラムを2CVのBuffer Gで溶出する。

g) カラムを最後に3CVのBuffer Hで溶出する。抗原を溶出する。

抗原陽性画分をブールする (30ml)。

## 【0058】

エンドトキシンをaffiprepクロマトグラフィーにより除去する。

Affi-Prep (登録商標) ポリミキシン支持体は、Affi-Prep (登録商標) Matrixに結合したUSPグレードPolymyxin Bからなる。そのエンドトキシンの脂質A成分への高いアフィニティーにより、ポリ

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O)/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3H<sub>2</sub>O)) pH6.8

K: 0M尿素、0.5Mアルギニン、0.15M NaCl、10mM PO<sub>4</sub> (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O)/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3H<sub>2</sub>O)) pH6.8

1) サンプル (15ml) を透析管材 (20.4mm直径及び6cmの高さ) に導入する。

## 【0063】

2) 透析管材を、2時間、4℃で攪拌しながら、Buffer Iを含む2リッターシリンダーに入れる。

3) 透析管材を、2時間、4℃で、Buffer Jを含む2リッターシリンダー (攪拌下) に入れる。

4) 透析管材を、4℃のO/Nで、(攪拌下で) Buffer Kを含む2リッターシリンダーに入れる。

## 【0064】

Millipore Sterile Millex-GV 0.22µ、13mm。カタログ番号: SLGV 0130S。

全てのステップは室温 (RT≒22℃) で行う。抗原は安定であるようである。

抗原溶液は0.2µmフィルターを通してろ過し、いずれの細菌増殖も防ぐ。

抗原はNunc容器中で-20℃に維持する。

## 【0065】

キャラクタリゼーション:

タンパク質D1/3-E6-Hisは次の通りキャラクタライズする。

タンパク質D1/3-E6-HisはプロテインD部分からの112アミノ酸を伴うこの3アミノ酸長ペプチドである。タンパク質D1/3-E6-Hisは32kDの理論分子量を有し、SDS-PAGEで33kDタンパク質として移動する。タンパク質D1/3-E6-Hisの理論等電点は8.17である。

## 【0066】

ウイルスのプロテインE6は14のシステイン残基を含む塩基性タンパク質であり、そのシステイン残基のうちの8つ (Cys30, 33, 63, 66及びC

ys103, 106, 136, 139)は2つのC末端の垂鉛結合モチーフに關与している。

タンパク質D1/3-E6-Hisは、ホールディングパートナーであるトランスのチオレドキシンと共に、大腸菌AR58株内で不溶性タンパク質として発現される。細胞培養は400mlフラスコで行う。

#### [0067]

1リッターの培養で5.4mgの95%純度のタンパク質が得られる。

実施例VI：融合タンパク質-D1/3-E6E7-his/HPV16を発現する大腸菌株の作製

##### 1. 発現プラスミドの作製

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589)は、インフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4-81がヘモフィルス・インフルエンゼ株772、バイオタイプ2 (H. Jansonら、1991, Infection and Immunity, Jan. p.119-125)の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に相当するコドンにより置換されている(上述の)pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテール(6His)のためのコドン領域がある。このプラスミドを用いて融合タンパク質D1/3-E6E7-Hisを発現させる。

#### [0068]

b) HPVゲノムE6及びE7配列型HPV16 (Seedorfら、Virology 1985, 145, p181-185)を、(Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzentrum fuer human pathogen Papillomavirusesから得た)pBR322にクローン化したHPV16全長ゲノムから増幅し、pUC19にサブクローン化してTCA301 (=pRIT14462)を供する。

#### [0069]

c) TCA301 (=pRIT14462)内のE6及びE7のためのコーディング配列を、(AfIII及びNsiI部位の間に挿入された)合成オリゴヌクレオチドアダプターで改変し、E6及びE7遺伝子の間の5ヌクレオチドの欠失を導入してE6の終止コドンを除去し、プラスミドTCA309 (=pRIT

上述の抽出物の遠心の後、上清及びペレットのアリコートでSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロットングにより分析した。

#### [0073]

そのペレット画分にある約48kDaの主要バンドをクマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウエスタン・ブロットに連結したNi-NTA (Qiagen cat. n° 34510)によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約1%を示す。

#### [0074]

##### 実施例VIb:

同様に、HPV16からのLipo D1/3及びE6-E7の融合タンパク質をチオレドキシンの存在下でトランス中で発現させた。ブレタンパク質(388aa)のN末端は、MDP残基及び次に(ヘモフィルス・インフルエンゼからの)リボプロテインDのシグナルペプチドの16アミノ酸を含み、それは生体内で開裂されて成熟タンパク質(370aa)を供する。リボプロテイン部分(aa1-127)の後に、融合したタンパク質E6及びE7がある。そのタンパク質のC末端にはTSGHHHHHが延長している。

#### [0075]

そのタンパク質を次のプロトコルにより精製した:

##### 実施例VII: リボプロテインD1/3-E6-E7-His (TIT) 精製

##### A) 可溶性

細胞ペーストをブローターゼインヒビターとして1mM Pefablocの存在下で2M NaCl、20mMホスフェート(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)中で60OD<sub>600</sub>まで懸濁し、次にフレンチプレス粉砕機(20,000psi)に3回通して細胞を溶解する。溶解した細胞を4℃で15,000gで30分、ペレット状にする。エンドトキシンレベルを減少させるために、組換えタンパク質を含む細胞ペレットを4M尿素、2M NaCl、20mMホスフェートpH7.5で2回、2% Empigen BB、20mMホスフェートpH7.5で1回、及び最後に20mMホスフェート緩衝液pH7.0で2回、洗って微量の洗剤を除去

14556)内に融合化E6及びE7コーディング配列を作る。図4を参照のこと。

#### [0070]

プラスミドTCA311 (=pRIT14512)の作製: 融合タンパク質-D1/3-E6E7-His/HPV16を発現するプラスミド

融合化E6E7タンパク質のアミノ酸1-249に対応するヌクレオチド配列をpRIT14556から増幅した。ポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE6E7融合化配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG MCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA311 (=pRIT14512)を供した(図5を参照のこと)。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に改変がおこっていないことを確認した。融合タンパク質D1/3-Hisのためのコーディング配列を図6に記載する。

#### [0071]

##### 2. AR58株の形質転換

プラスミドpRIT14512をλPLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失入りソグエンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88)に導入した。

##### 3. 細菌株の増殖及び誘導-Protein D1/3-E6E7-Hisの発現

プラスミドpRIT14512で形質転換したAR58の細胞を、30℃で50µg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39℃にシフトしてレプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E6E7-Hisの合成に向かわせた。39℃でのインキュベーションを4時間、続けた。細菌をペレット化し、-20℃で保存した。

#### [0072]

4. 融合タンパク質D1/3-E6E7-Hisのキャラクタリゼーション  
凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁した。細胞を20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する(3回)。その抽出物を16,000gで30分、4℃で遠心する。

する(各々の洗浄は、細胞懸濁に用いたのと同じ容量で行う)。LipoProt D1/3-E6-E7-His (TIT)を、0.2M β-メルカプトエタノール(=βMeOH)、20mM PO<sub>4</sub> pH12中の8M尿素により(細胞懸濁に用いたのと同量で)4℃で一晩で溶かし、次にRTで同じ緩衝液中で2時間、インキュベートする。細胞デブリスを4℃で15,000gで30分、ペレット状にする。上清を-20℃に維持する。

#### [0076]

##### B) 精製

1) Q-Sepharoseファーストフローでのアニオン交換クロマトグラフィー

225mlの凍結サンプルを冷水浴中で室温で解凍し、8M尿素、0.2M βMeOH、20mM PO<sub>4</sub> pH12で予め平衡化したQ-Sepharoseファーストフローカラム(Pharmacia, XK 26/20)(30ml樹脂/225ml上清)に45cm/hで適用する。OD280nmがベースラインに達するまで、カラムを8M尿素、0.2M βMeOH、20mM PO<sub>4</sub> pH12により洗い、次に8M尿素、20mMホスフェートpH12(2カラム容量)で第2の洗浄を行う。8M尿素、20mMホスフェートpH12中のNaClのステップ(0.1M, 0.25M, 0.5M NaCl、各々のステップは約2カラム容量)により45cm/hで溶出を行う。0.5M NaClで溶出した画分をブールする。

#### [0077]

##### 2) イオン金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC)

Q-Sepharoseステップから0.5M NaClで溶出した画分をブールし、0.2M NaCl、8M尿素、20mMホスフェートpH10に対して透析し、次に8M尿素、20mM PO<sub>4</sub> pH12で予め平衡化したNi<sup>2+</sup>-NTA (Qiagen)カラム(XK 26/20, Pharmacia)(30ml樹脂/61mlサンプル)に5.6cm/hで充填する。ベースラインに達するまでカラムを8M尿素、20mM PO<sub>4</sub> pH12で洗い、次に8M尿素、20mM PO<sub>4</sub> pH10で洗う。抗原を45cm/hで、8M尿素中のイミダゾールステップ(0.025M, 0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2M, 0.5Mイミダゾール;各々の



ステップは2カラム容量)により溶出する。0.05Mイミダゾールで溶出した面分をブールする。

【0078】

#### C) 濃縮

ImacサンプルをRT<sup>+</sup>で、AMICONからの攪拌セル中の5kDa Filtern Omega 膜で約5倍に(0.407mg/ml)に濃縮する。

#### D) 透析

濃縮したサンプルを、0.5Mアルギニン、150mM NaCl、10mM PO<sub>4</sub> pH6、8中減少する尿素濃度ステップ(4M, 2M尿素)に対してRTで透析する。0.5Mアルギニン、150mM NaCl、10mM PO<sub>4</sub> pH6、8に対する最後の透析を4℃で行う。

【0079】

#### 結果:

IMACステップは、0.025Mイミダゾールで32kD汚染物を除することができ、特定の抗原も溶出した。0.05Mイミダゾール溶出抗原はSDS-PAGEのクマシーブルー染色により90%純度と評価される。これらの2つの精製ステップの後、サンプルは大腸菌汚染物を含まない。特定の抗原-N及び/又はC末端抗体を用いるウエスタン・ブロッティング分析は、全長タンパク質より高い及び低いMWのバンドの不均一パターンを示す。このパターンは、全長タンパク質と同時に精製された、凝集物及び不完全に処理されたタンパク質及び/又は分解したものの存在を示す。

【0080】

実施例VIII: 融合Prot D1/3-E7変異(cys24→gly, glu26→gln)型HPV16を発現する大腸菌株B1002の作製

#### 1) 発現プラスミドの作製

##### 出発材料:

a) 融合Prot D1/3-E7-HisをコードするプラスミドpRIT14501(=TCA308)

b) クローニングベクターpUC由来のプラスミドLITMUS28(New En

n)-His/HPV16を発現する株B1002の作製

プラスミドpRIT14733をλPLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失入りソリゲンを含む大腸菌AR58(Mottら、1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88)に導入してカナマイシンに対して耐性の形質転換体についての選択により株B1002を供した。

【0083】

3) 細菌株B1002の増殖及び誘導-Prot D1/3-E7変異(cys24→gly, glu26→gln)-His/HPV16の発現

プラスミドpRIT14733で形質転換したAR58の細胞(B1002株)を30℃で、50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39℃にシフトしてλレプレッサーを不活性化し、Prot D1/3-E7変異His/HPV16の合成に切りかえた。39℃でのインキュベーションを4時間、続けた。細菌をベレット状にし、-20℃で保存した。

【0084】

4) 融合Prot D1/3-E7変異(cys24→gly, glu26→gln)-His型HPV16のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁した。細胞を20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊した(3回)。その抽出物を16,000gで30分、4℃で遠心した。

【0085】

上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロッティングにより分析した。

そのベレット面分にある約33kDaの主要バンドをクマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル22J70抗プロテインDにより、Zymedからのモノクローナル抗E7/HPV16により、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したNi-NTA (Qiagen cat n° 34510)によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約3~5%を示す。

gland Biolabs cat n° 306~28)

c) ヘモフィルス・インフルエンゼ株722、バイオタイプ2(H. Jansonら、1991, Infection and Immunity, Jan. p.119~125)の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に対応するコドンにより、インフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4-81が置換されているpMG81(上述)の誘導体であるプラスミドpMG MCS Prot D1/3(pRIT14589)、Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域(6His)がある。

【0081】

プラスミドpRIT14733(=TCA347)の作製: Hisテールを有する融合タンパク質-D1/3-E7変異体(cys24→gly, glu26→gln)を発現するプラスミド

Hisテールが伸長したHPV16からのE7遺伝子のコーディング配列を有するpRIT14501(=TCA308)からのNcoI-XbaIフラグメントを変異誘発のために役立つ中間体ベクターLitmus28にサブクローン化してpRIT14909(=TCA337)を供した。網膜芽細胞遺伝子の癌抑制遺伝子産物への結合を妨害するために二重変異:cys24→gly(Edmonds及びVousden, J.Virology 63: 2650(1989))及びglu26→gln(Phelpsら、J.Virology 66: 2418~27(1992))を選択した。E7遺伝子中の変異の導入は、キット"Quick Change Site directed Mutagenesis(Stratagene cat n° 200518)で実現し、プラスミドpRIT14681(=TCA343)を供した。配列決定により変異の存在及び完全なE7遺伝子の組込みを確認した後、変異したE7遺伝子をベクターpRIT14589(=pMG MCS Prot D1/3)に導入してプラスミドpRIT14733(=TCA347)を供した(図7)。

【0082】

融合タンパク質-D1/3-E7変異(cys24→gly, glu26→gln)-Hisについての配列を図8に示す。

2) Prot D1/3-E7変異(cys24→gly, glu26→gln)

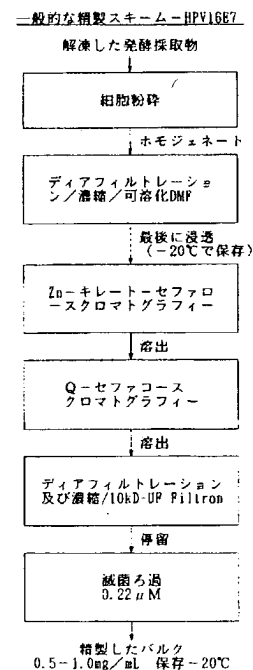
【0086】

B1002の細胞を遠心により培養液から分離した。B1002の濃縮細胞を-65℃に保存した。

実施例IX: PROT D1/3 E7(Dmutant) HPV16の精製

【0087】

【表1】



【0088】

a) 細胞懸濁液の調製

B1002の凍結濃縮細胞を溶解し、(約25g DCWL-1の細胞濃度に相当する)60の最終的光学密度OD<sub>650</sub>まで+4℃で細胞粉碎緩衝液(表1を参照)に再度懸濁した。

#### b) 細胞粉碎

細胞を、高圧ホモジェナイザー(Rannie)に1000barで2回通すことにより粉碎した。その粉碎した細胞懸濁液を4℃に維持したフラスコに収集した。

[0089]

細胞粉碎緩衝液: 3N HClでpHを7.5に調節したNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.02N)、NaCl (2M)

#### 精製

2a) 動的膜ろ過 (DMF (登録商標) —PALL FIVTRON)

2リッターの粉碎した細胞懸濁液(OD60)を、0.2μmカットオフ膜を備えたPALLからの動的ろ過システム、DMF (登録商標) に充填する。

[0090]

2リッターから1リッターに濃縮してサンプルPCC1を供し、empigen-EDTA緩衝液(濃度EDTA 1.86g、Empigen (30%) 3.33ml、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.5M 40.00ml)の3容量(3L)で一定容量で洗ってサンプルPD1を供し、

1Lから300mlに濃縮してサンプルPCC2を供し、

empigen緩衝液(濃度L-1: Empigen 30%、3.33ml、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.5M 40ml) pH7.5の10容量(3L)で一定容量で洗ってサンプルを供し、

同じ容量(300ml)の塩酸グアニジン8M緩衝液(濃度L-1: Gu. HCl 764g; Empigen 30%、3.33ml、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.5M 40ml) pH7.5を加えてタンパク質を可溶化し、

タンパク質を回収する: 最初の容量(300ml)への濃度及び3容量の塩酸グアニジン4M緩衝液(濃度L-1: Gu. HCl 328.12g; Empigen (30%) 3.33ml PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.5M 40.00ml) pH7.5でのディ

24g PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.5M 40.00ml)で洗い—サンプルQS-W1

empigenを含まない尿素6M緩衝液約10容量(尿素360.36g/L)で洗い—サンプルQS-W2

約5容量の尿素6M—NaCl 200mM緩衝液(濃度L-1: 尿素360.36g NaCl 11.69g、40.00ml PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)で溶出し、

約3容量の尿素6M—NaCl 500mM緩衝液(先と同じだかNaCl 29.22g/L)で溶出し、画分の正確な終りをUVピークにより決定し—サンプルQS-500

4容量の尿素4M—NaCl/M緩衝液(濃度L-1尿素360.36、NaCl 58.44g、40.00ml PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (0.51)で溶出する—サンプルQS-1M

次にカラムをNaOH 0.5Mで洗う。

[0094]

QS—セファロース溶出物(QS-500)は次の精製ステップまで2~8℃の間に保存する。

Q—セファロースクロマトグラフィー作業は室温で行う。

2d) 限外ろ過

次にQS-500画分を10kD限外ろ過ユニット(Ultrasette-Pall Filtron)で処理する。

[0095]

産物を最初に約1mg/mlのタンパク質に濃縮し、次に10容量のホスフェート緩衝液に対してディアフィルトレーションする。

浸透物(画分UF-P)を捨て、停留物(画分UF-R)を最後のろ過まで2~8℃で保存する。

限外ろ過作業は2~8℃で行う。

[0096]

2e) 最終的なろ過

最後のバルク(UF-R画分)を層流下で無菌クラス100室で0.22μm滅菌フィルター(Millipak-Millipore)でろ過する。最終濃度は0.5~1.0

アフィルトレーションの間に浸透物—サンプルP3を収集。

[0091]

これら全てのステップは、冷室(2~8℃)で0.5M PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>で調整したpHで行う。

P3画分は次の精製ステップまで-20℃で保存する。

2b) Zn—キレート化セファロースクロマトグラフィー

P3画分を溶解し、充填し、平衡化したZn—キレート化セファロースFFに注入する。

[0092]

その後、そのカラムを、

約3容量の塩酸グアニジン4M緩衝液(上述)で洗い—サンプルZn—FT

約5容量の尿素4M緩衝液(濃度L-1: 尿素240.24g Empigen 3.33ml、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.5M 40.00ml)で洗い—サンプルZn—W / 上述と同じであるが、イミダゾール34.04gの濃度である約3容量の尿素4M—イミダゾール20mM緩衝液(濃度L-1: 尿素240.24g Empigen (30%) 3.33mlイミダゾール(1.36g) PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.5M 40.00ml pH7.5)で溶出し—サンプルZn-20

尿素4M—イミダゾール500mMでUVピークの終りまで溶出する—サンプルZn-500

カラムをEDTA 50mM及びNaOH 0.5Mで洗う。Zn—キレート化セファロース溶出液(Zn-500)を次の精製ステップまで2~8℃で保存する。

[0093]

Zn—キレート化セファロースクロマトグラフィーの作業は室温で行う。

2c) Q—セファロースクロマトグラフィー

Zn-500画分を、充填し平衡化したQ—セファロースFFに注入する。

その後、カラムを、約7容量の尿素4M緩衝液(上述)で洗い—サンプルQS—FT

empigenを含まない尿素4M緩衝液約10容量(濃度L-1尿素240.

μg/mlである。その滅菌バルクを-20℃に保存する。

実施例X: 融合c l y t a—E 6—H i s (HPV16)を発現する大腸菌株の作製

1. 発現プラスミドの作製

a) 融合Prot D1/3—E 6—H i s /HPV16をコードするプラスミドpRIT14497(=TCA307)

b) ストレプトコッカス・ニューモニエのLy t aの117C末端コドンについてのコーディング配列を含む中間体ベクターであるプラスミドpRIT14661(=DVA2)。Ly t aは、N—アセチル—L—アラニンアミダーゼ、(Ly t a遺伝子(Gene, 43 (1986) p265~272)によりコードされるアミダーゼLYTA、ペプチドグリカン骨格中の特定の結合を特異的に分解するオートリシンを合成するシュドモナス・ニューモニエから得られる。LYTAタンパク質のC末端ドメインはコリン又はDEAEのような特定のコリンアナログに対するアフィニティーの原因である。

[0097]

1. b. プラスミドpRIT14634(=TCA332)の作製: 融合nc l y t a—E 6—H i s /HPV16を発現するプラスミド

a) 最初のステップは、プラスミドpRIT14497からの大きなNco I—A f I I I制限フラグメントの精製及びpRIT14661からの小さなA f I I I—A f I I I I制限フラグメントの精製であった。

[0098]

b) 第2のステップは、pLプロモーターの制御下で融合タンパク質c l y t a—E 6—H i sをコードするプラスミドpRIT14634(=TCA332)を作り出す、E 7—H i s配列へのc l y t a配列の連結(Nco I及びA f I I I Iは適合性制限部位である)であった(図9参照)。

融合タンパク質c l y t a—E 6—H i sのためのコーディング配列を図10に記載する。

[0099]

AR58株の形質転換

プラスミドpRIT14634をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失λリソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci., 82: 88) に導入した。

#### 細菌株の増殖及び誘導-clyta-E6-Hisの発現

プラスミドpRIT14634で形質転換したAR58の細胞を、30℃で50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39℃にシフトしてλレプレッサーを不活性化し、clyta-E6-Hisの合成に向かわせた。39℃でのインキュベーションを4時間、続けた。細菌をベレット化し、-20℃で保存した。

[0100]

#### 4. 融合clyta-E6-Hisのキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する(3回)。その抽出液を4℃で30分、16,000gで遠心する。上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロッティングにより分析した。

[0101]

ベレット画分中にある約33kDaの主要バンドをクーマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗clyta抗体により、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したN-NTAコンジュゲート (Qiagen cat. n° 34510) によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルはクーマシー染色したSDS-ポリアクリルアミドゲル上に示される通り、全タンパク質の約3%を示す。

[0102]

実施例XI: 融合clyta-E7-His (HPV16) を発現する大腸菌株の作製

#### 1. 発現プラスミドの作製

##### 1. a. 出発材料

a) 融合Prot D1/3-E7-His/HPV16をコードするプラス

#### 4. 融合clyta-E7-Hisのキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する(3回)。その抽出液を4℃で30分、16,000gで遠心する。上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロッティングにより分析した。

[0107]

ベレット画分中にある約35kDaの主要バンドをクーマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗clyta抗体により、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したN-NTAコンジュゲート (Qiagen cat. n° 34510) によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルはクーマシー染色したSDS-ポリアクリルアミドゲル上に示される通り、全タンパク質の約5%を示す。

[0108]

実施例XII: 融合clyta-E6E7-His (HPV16) を発現する大腸菌株の作製

#### 1. 発現プラスミドの作製

##### 1. a. 出発材料

a) 融合Prot D1/3-E6E7-His/HPV16をコードするプラスミドpRIT14512 (=TCA311)

b) ストレプトコッカス・ニューモニエのLytAの117C末端コドンについてのコーディング配列を含む中間体ベクターであるプラスミドpRIT14661 (=DVA2)。

[0109]

1. b. プラスミドpRIT14629 (=TCA331) の作製: 融合clyta-E6E7-His/HPV16を発現するプラスミド

a) 最初のステップは、プラスミドpRIT14512からの大きなNcoI-AflIII制限フラグメントの精製及びpRIT14661からの小さなAflIII-AflIII制限フラグメントの精製であった。

ミドpRIT14501 (=TCA308)

b) ストレプトコッカス・ニューモニエのLytAの117C末端コドンについてのコーディング配列を含む中間体ベクターであるプラスミドpRIT14661 (=DVA2)。

[0103]

1. b. プラスミドpRIT14626 (=TCA330) の作製: 融合clyta-E7-His/HPV16を発現するプラスミド

a) 最初のステップは、プラスミドpRIT14501からの大きなNcoI-AflIII制限フラグメントの精製及びpRIT14661からの小さなAflIII-AflIII制限フラグメントの精製であった。

[0104]

b) 第2のステップは、pLプロモーターの制御下で融合タンパク質clyta-E7-HisをコードするプラスミドpRIT14626 (=TCA330) を作り出す、E7-His配列へのclyta配列の連結 (NcoI及びAflIIIは適合性制限部位である) であった (図11参照)。

融合タンパク質clyta-E7-Hisのためのコーディング配列を図12に記載する。

[0105]

#### 2. AR58株の形質転換

プラスミドpRIT14626をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失λリソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci., 82: 88) に導入した。

#### 3. 細菌株の増殖及び誘導-clyta-E7-Hisの発現

プラスミドpRIT14626で形質転換したAR58の細胞を、30℃で50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39℃にシフトしてλレプレッサーを不活性化し、プロテインclyta-E7-Hisの合成に向かわせた。39℃でのインキュベーションを4時間、続けた。細菌をベレット化し、-20℃で保存した。

[0106]

[0110]

b) 第2のステップは、pLプロモーターの制御下で融合タンパク質clyta-E6E7-HisをコードするプラスミドpRIT14629 (=TCA331) を作り出す、E7-His配列へのclyta配列の連結 (NcoI及びAflIIIは適合性制限部位である) であった (図#13参照)。

融合タンパク質clyta-E6E7-Hisのためのコーディング配列を図14に記載する。

[0111]

#### 2. AR58株の形質転換

プラスミドpRIT14629をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失λリソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci., 82: 88) に導入した。

#### 3. 細菌株の増殖及び誘導-clyta-E6E7-Hisの発現

プラスミドpRIT14629で形質転換したAR58の細胞を、30℃で50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39℃にシフトしてλレプレッサーを不活性化し、プロテインclyta-E6E7-Hisの合成に向かわせた。39℃でのインキュベーションを4時間、続けた。細菌をベレット化し、-20℃で保存した。

[0112]

#### 4. 融合clyta-E6E7-Hisのキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する(3回)。その抽出液を4℃で30分、16,000gで遠心する。

上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロッティングにより分析した。

[0113]

ベレット画分中にある約35kDaの主要バンドをクーマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗clyta抗体により、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したN-

NTAコンジュゲート (Qiagen cat. n° 34510) によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約1%を示す。

#### [0114]

実施例XIII: Prot D1/3 E7 His (HPV18) (大腸菌B1011)

トランスのチオレドキシンと共に発現されるタンパク質D1/3 E7 His HPV

##### 1) 発現プラスミドの作製

1) a. 融合タンパク質-D1/3-E7-His/HPV18を発現するプラスミドであるプラスミドTCA316 (=pRIT14532) の作製

##### 出発材料

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) はインフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4~81がヘモフィルスインフルエンゼ株772、バイオタイプ2 (H Jansonら、1991, Infection and Immunity, Jan. p119-125) の成熟プロテインDの残基Ser20-Thr127に相当するコドンにより置換されている (WO97/01640として公開されたUK特許出願n° 9513261, 9に記載される) pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位 (11残基) 及びC末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域 (6His) がある (図15を参照)。このプラスミドを融合タンパク質D1/3-E7-Hisを発現させるのに用いる。

#### [0115]

b) 原型HPV18のHPVゲノムE6及びE7配列 (Coleら、J.Mol.Biol. (1987) 193, 599 ~ 608) を、(Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomaviruses-D69120-Heidelberg から得た) pBR322にクローン化したHPV16全長ゲノムから増幅し、pUC19にサブクローン化してTCA302 (=pRIT14467) を供した。

#### [0116]

TCA316 (=pRIT14532) の作製

##### 2) AR58株の形質転換

2) a. Prot D1/3-E7-His/HPV18を発現する株B1011を得ること

プラスミドpRIT14532を、カナマイシンに耐性の形質転換体についての選択により、 $\lambda$ pLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失 $\lambda$ リソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci. 82: 88) に導入した。

#### [0119]

2) b. Prot D1/3-E7-His/HPV18及びチオレドキシンを発現する株B1012の作製

プラスミドpRIT14532及びpRIT14523を、カナマイシン及びアンピシリンに耐性である形質転換体のための二重選択により、 $\lambda$ pLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失 $\lambda$ リソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci. 82: 88) に導入した。

#### [0120]

3) 細菌株B1011の増殖及び誘導トランスのチオレドキシンあり及びなしのProt-D1/3-E7-His/HPV18の発現

プラスミドpRIT14532で形質転換したAR58の細胞 (B1011株) 並びにプラスミドpRIT14532及びpRIT14523で形質転換したAR58の細胞 (B1012株) を、30℃でB1011株について50  $\mu$ g/mlのカナマイシンを補給し、B1012株について50  $\mu$ g/mlのカナマイシン及び100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39℃にシフトして $\lambda$ レプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E7-His/HPV18の合成に向かわせた。39℃でのインキュベーションを4時間、続けた。細菌をベレット化し、-20℃で保存した。

#### [0121]

融合タンパク質D1/3-E7-His/HPV18のキャラクタリゼーション

E7のアミノ酸1-105に相当するヌクレオチド配列をpRIT14467から増幅した。そのポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE7配列の5' 及び3' 端に作り、プラスミドpMG MCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA316 (=pRIT14532) を供した。その挿入物を配列決定して改変対E7/HPV18原型配列を、グルタミン酸によるグリシンの置換 (E7中のaa43、融合タンパク質中の位置156) を作り出すE7遺伝子 (ヌクレオチド128G→A) 中で同定した。その融合タンパク質-D1/3-E7-His/HPV16についての配列を図16に記載する。

#### [0117]

1) b. プラスミドTCA313 (=pRIT14523) の作製: チオレドキシンを発現するプラスミド

##### 出発材料

a) 複製のColE1又はP15a起点を含むプラスミドと適合可能であるプラスミドpBBR1MCS4 (Antoine R 及びC.Locht, Mol.Microbiol. 1992, 6, 1785 ~ 1799; M.E.Kovachら、Biotechniques 16 (5), 800 ~ 802)

b) ラムダファージのプロモーターpLを含むプラスミドpMG42 (WO93/04175に記載)

c) チオレドキシンのためのコーディング配列及び次にAspA転写ターミネーターを有するプラスミドpTRX (Invitrogen, Kit Thiofusion K350-01)

プラスミドTCA313 (=pRIT14523) の作製

pLプロモーターを有するpMG42からのフラグメントEcoRI-NdeIフラグメント、及びチオレドキシンのコーディング配列の後にAspAターミネーターを有するpTRXからのNdeI-HindIII フラグメントを精製し、プラスミドベクターpBBR1MCS4のEcoRI及びHindIII 部位に連結してプラスミドTCA313 (=pRIT14523) を供した (図17を参照)。

#### [0118]

チオレドキシンについての配列を図18に記載する。

##### 抽出物の調製

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁する。細菌を、20,000psi でフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する (3回)。その抽出液を4℃で30分、16,000gで遠心する。

#### [0122]

SDS-ポリアクリルアミドゲル及びウエスタン・ブロットでの分析

上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロットングにより分析した。

融合prot D1/3-E7-His (約31kDa) を、株B1011についてベレット画分中で株B1012について上清中に局在化した (30%) 画分でクマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したNi-NTAコンジュゲート (Qiagen cat. n° 34510) によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルはクマシー染色したSDS-ポリアクリルアミドゲル上に示される通り、全タンパク質の約1~3%を示す。

#### [0123]

株B1012の抽出のために、チオレドキシン (約12kDa) を上清中のクマシー染色したゲルにより可視化し、モノクローナル抗チオレドキシン (Invitrogen R920-25) によりウエスタンブロットで同定した。

Prot D1/3-E7-his/HPV18の精製

組換えHPV18-Prot D1/3-E7-Hisを (上述の) 大腸菌AR58株内で発現させる。全てのステップを室温 (RT  $\approx$  22℃) で行う。タンパク質はOD<sub>280nm</sub> をモニターすることにより追跡する。ステップの間、抗原陽性画分は-20℃に維持する。

#### [0124]

精製した抗原は-20℃及び4℃で1週間、安定である (分解しない) が、37℃でのインキュベーション後により酸化しやすいようである。

d) 溶解度

タンパク質溶解度はpH<7.4で溶解度が減少し、pH依存性である:

PBS pH7.4	686 $\mu$ g/ml	100%
PBS pH7.2	560 $\mu$ g/ml	81%
PBS pH7.0	498 $\mu$ g/ml	72%
PBS pH6.8	327 $\mu$ g/ml	48%

e) HPV18 Prot D1/3 E7タンパク質は227アミノ酸から構成される。その理論分子量は25.9kDaであり、5.83の理論等電点である。それは還元SDS-PAGEにおいて約31.5kDaに動く。

#### [0125]

実施例XIV: HPV18タンパク質D1/3 E7の精製

##### a) 可溶化

細胞ペーストを2M NaCl、20mMホスフェート ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) pH7.6中60 OD<sub>600</sub>に懸濁し、その後、Rennie粉砕機に2回通すことにより細胞を溶解させる。溶解した細胞を4℃でJA10ローター内で9,000rpmで30分、ペレット化する。エンドトキシンレベルを減少させるために、粗懸液タンパク質を含む細菌細胞ペレットを5mM EDTA、2M NaCl、PBS pH7.4で1回; 4M尿素、20mMホスフェートpH7.4中で1回、そして最後にPBS pH7.4中で1回洗って微量のEDTAを除去する(各々の洗浄は、細胞懸濁のために用いる容量の2倍で行う)。HPV18-Prot. D1/3-E7-His (トランスのチオレドキシンについてTIT)を6M塩化のアニジン、50mM PO4 pH7.6により一晩、4℃で(細胞懸濁液のために用いたのと同じ容量で)可溶化した。細胞デブリスを4℃でJA10ローターで9,000rpmで30分、ペレット状にする。上清に0.5% Empigen BBを補給し、30分、RTでインキュベートする。

#### [0126]

##### b) 精製

##### 1) a. 固定化金属アフィニティークロマトグラフィー

125mlのサンプルを、0.5% Empigen BB、6M塩化グアニジン、50mM PO4 pH7.6で予め平衡化したZn<sup>2+</sup>-キレート化セファロー

PBS pH7.2	560 $\mu$ g/ml	81%
PBS pH7.0	498 $\mu$ g/ml	72%
PBS pH6.8	327 $\mu$ g/ml	48%

HPV18-Prot D1/3-E7-Hisタンパク質は227アミノ酸から構成される。その理論分子量は25.9kDaである。それは還元SDS-PAGEで約31.5kDaに移動する。理論等電点は5.83である。

#### [0131]

実施例XV: 融合Prot D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→gln)型HPV18の作製

##### 1) 発現プラスミドの作製

出発材料:

a) 融合Prot D1/3-E7-HisをコードするプラスミドpRIT14532.(=TCA316)

b) プラスミドLITMUS28 (New England Biolabs cat n° 306-28)、クローニングベクターpUC由来

c) プラスミドpMG MCS Prot D1/3 (pRIT14589)、ヘモフィルスインフルエンゼ株772、バイオタイプ2 (H.Jansonら、1991、Infection and Immunity, Jan. p.119-125)の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に対応するコドンによりインフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4~81が置換されている(上述の)pMG81の誘導体。Prot-D1/3の配列の後に、多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテール(6His)のためのコーディング領域がある。

#### [0132]

pRIT14831 (=TCA355)の作製: Hisテールを有する融合タンパク質-D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→gln)を発現するプラスミド

Hisテールが伸長したHPV18からのE7遺伝子のコーディング配列を有するpRIT14532 (=TCA316)からのNcoI-XbaIフラグメントを変異のために有用な中間体ベクターLitmus28にサブクローン化し

スFFカラム (XK 26/20, Pharmacia; 50mlゲル/125ml可溶化)に充填する。カラムを塩化グアニジン6M、PO4 50mM pH7.6によりベースラインに達するまで洗い、次に6M尿素、0.5M NaCl、50mM PO4 pH7.6で洗う。抗原を2ml/分で6M尿素、0.5M NaCl、50mM PO4 pH7.6中0.25Mイミダゾールにより溶出する(図1B)。IMACで溶出したサンプルを4℃でPBS pH7.4に対して透析する。

#### [0127]

##### 1) b. Affi-Prep (登録商標) Polymyxin (Bio-Rad)

エンドトキシンレベルを減少させるために、28mg (37ml)の抗原を、PBS pH7.4で予め平衡化した2mlのAffi prep Polymyxin 樹脂でパッチモードでインキュベートする。タンパク質回収は60%と評価されエンドトキシン含有量は6.5倍、減少する。

#### [0128]

##### 1) c. 分析

還元SDS-PAGEで分析した精製した抗原は、クーマシーブルー又は銀染色の後、主要30kDaバンド及び55kDaの第2のバンドを示す。非還元SDS-PAGEにおいてHPV18-Prot D1/3-E7-Hisは主に175kDa以上の分子量で主にスミアのように現れる。しかしながら、この酸化は、5mMのβ-メルカプトエタノールの添加により回収することができる。このパターンは、抗Prot Dにより又は抗Hisウエスタン・プロット分析により確認する。

#### [0129]

##### c) 安定性

精製した抗原は-20℃及び4℃で一週間、安定である(分解なし)が、37℃でのインキュベーション後より酸化しやすいようである。

##### d) 溶解度

タンパク質溶解度はpH依存性(以下を参照)でpH7.4で溶解度が減少する。

#### [0130]

PBS pH7.4	686 $\mu$ g/ml	100%
-----------	----------------	------

てpRIT14910 (=TCA348)を供する。E7/HPV16変異誘発との類似性により、網膜芽細胞遺伝子の癌抑制遺伝子産物(pR13)への結合を妨害するために二重変異cys27→gly及びglu29→glnを選択した。

#### [0133]

E7遺伝子中の変異の導入をキット "Quick Change Site directed Mutagenesis (Stratagene cat n° 200518)で実現した。pRIT14532はHPV18の原型配列におけるグリシンのかわりにE7の位置43におけるグルタミン酸の存在を示したので、位置43にグリシンを導入するために変異誘発の第2サイクルを行った。我々は、プラスミドpRIT14829 (=TCA353)を得た。配列決定により完全なE7遺伝子の変異及び相込みの存在を確認した後、その変異したE7の遺伝子をベクターpRIT14589 (=pMG MCS Prot D1/3)に導入してプラスミドpRIT14831 (=TCA355)を供した(図17を参照)。

#### [0134]

融合タンパク質-D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→gln)-Hisについての配列は図18に記載される。

##### 2) Prot D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→gln)-His/HPV18を発現する株B1098の作製

プラスミドpRIT14831を、 $\lambda$ PLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失 $\lambda$ リソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, Proc Natl. Acad. Sci. 82: 88)に導入し、カナマイシンに耐性である形質転換体についての選択により株B1098を供した。

#### [0135]

##### 3) 細菌性B1098の増殖及び誘導Prot D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→gln)-His/HPV18

プラスミドpRIT14831で形質転換したAR58の細胞(B1098株)を50  $\mu$ g/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で30℃で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39℃にシフトして $\lambda$ レプレッサーを不活性化

化し、Prot D1/3-E7変異-His/HPV18の合成に向かわせた。39℃でのインキュベーションを4時間続けた。細胞をベレット状にし、-20℃で保存した。

#### [0136]

4) 融合Prot D1/3-E7変異(cys24-gly, glu26-gln)-His型HPV16のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁した。細胞を20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する(3回)。その抽出物を16,000gで30分、4℃で遠心する。

#### [0137]

SDS-ポリアクリルアミドゲル及びウエスタンブロットでの分析

上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートでSDS-ポリアクリルアミドゲル及びウエスタン・ブロットングにより分析した。そのベレット画分にある約31kDaの主要バンドをクーマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル22J70抗プロテインDにより及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するモノクローナルPenta-His (Diagen cat. n° 34660)によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約3~5%を示す。

#### [0138]

実施例XVI: 融合タンパク質D1/3-E6-His/HPV18の作製

##### 1. 発現プラスミドの作製

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) はインフルエンザからのNS1コーディング領域のコードン4~81がヘモフィルス・インフルエンゼ株772、バイオタイプ2 (H Jansonら、1991, *Infection and Immunity*, Jan. p119-125) の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に相当するコードンにより置換されている(上述の)pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多量クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域(6His)がある。このプラスミドを融合タンパク質D1/3-E6-Hisを発現させるのに用いる。

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する(3回)。その抽出液を4℃で30分、16,000gで遠心する。上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロットングにより分析した。ベレット画分中にある約32kDaの主要バンドをクーマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したNi-NTAコンジュゲート (Qiagen cat. n° 34510)によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約3~5%を示す。

#### [0143]

実施例XVII: 融合タンパク質-D1/3-E6-E7-His (HPV18)を発現する大腸菌株の作製

##### 1. 発現プラスミドの作製

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) はインフルエンザからのNS1コーディング領域のコードン4~81がヘモフィルス・インフルエンゼ株772、バイオタイプ2 (H Jansonら、1991, *Infection and Immunity*, Jan. p119-125) の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に相当するコードンにより置換されている(上述の)pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多量クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域(6His)がある。このプラスミドを融合タンパク質D1/3-E6-E7-Hisを発現させるために用いる。

#### [0144]

b) HPVゲノムE6及びE7配列タイプHPV18 (Coleら、J.Mol.Biol. 1987, 193, p.599~608) を、(Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomaviruses-D69120-Heidelberg から得た)pBR322にクローン化したHPV18全長ゲノムから増幅し、pUC19にサブクローン化してTCA302 (=pRIT14467)を供した。

#### [0139]

HPVゲノムE6及びE7配列タイプHPV16 (Coleら、J.Mol.Biol. 1987, 193, p.599~608) を、(Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomaviruses-D69120-Heidelberg から得た)pBR322にクローン化したHPV18全長ゲノムから増幅し、pUC19にサブクローン化してTCA302 (=pRIT14467)を供した。

#### [0140]

プラスミドTCA314 (=pRIT14526)の作製: 融合タンパク質-D1/3-E6-His/HPV18を発現するプラスミド

E6のアミノ酸1-158に相当するヌクレオチド配列をpRIT14467から増幅する。そのポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE6配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG MCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA314 (=pRIT14526)を供した(図21を参照)。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に改変が形成されていないことを確認した。その融合タンパク質-D1/3-E6-His (HPV16)についての配列を図22に記載する。

#### [0141]

AR58株の形質転換

プラスミドpRIT14526をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失リソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 82: 88)に導入した。

##### 3. 細菌株の増殖及び誘導-Protein-D1/3-E6-Hisの発現

プラスミドpRIT14526で形質転換したAR58の細胞を、30℃で50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細胞を39℃にシフトしてレプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E6-Hisの合成に向かわせた。39℃でのインキュベーションを4時間、続けた。細胞をベレット化し、-20℃で保存した。

#### [0142]

##### 4. 融合タンパク質D1/3-E6-Hisのキャラクタリゼーション

#### [0145]

c) TCA302 (=pRIT14467)中のE6及びE7のためのコーディング配列を、E6及びE7遺伝子の間の11ヌクレオチドの欠失を導入し、E6の終止コードンを除去し、そしてプラスミドTCA320 (=pRIT14618)中に融合したE6及びE7コーディング配列を作る(HgaI及びNsiI部位の間に挿入した)合成オリゴヌクレオチドアダプターで改変した。図23を参照のこと。

#### [0146]

TCA328 (=pRIT14567)の作製: 融合タンパク質-D1/3-E6-E7-His/HPV18を発現するプラスミド

融合E6-E7タンパク質のアミノ酸1-263に相当するヌクレオチド配列をpRIT14618から増幅する。そのポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE6-E7融合配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG MCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA328 (=pRIT14567)を供した(図24を参照)。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に改変が形成されていないことを確認した。その融合タンパク質-D1/3-E6-E7-Hisについての配列を図25に記載する。

#### [0147]

##### 2. AR58株の形質転換

プラスミドpRIT14567をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失リソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 82: 88)に導入した。

##### 3. 細菌株の増殖及び誘導-Protein-D1/3-E6/E7-Hisの発現

プラスミドpRIT14512で形質転換したAR58の細胞を、30℃で50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細胞を39℃にシフトしてレプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E6-E7-Hisの合成に向かわせた。39℃でのインキュベーションを4時間、続けた。細胞をベレット化し、-20℃で保存した。

【0148】

4. 融合タンパク質D1/3-E7-His (HPV16) のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20、000psi でフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する(3回)。その抽出液を4℃で30分、16、000gで遠心する。

【0149】

上述の抽出物の遠心の後、上清及びペレットのアリコートをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロッティングにより分析した。ペレット画分中にある約45kDaの主要バンドをクーマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したNi-NTAコンジュゲート (Qiagen cat. no. 34510) によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約1%を示す。

【0150】

実施例VIII : ワクチン製剤

ワクチンを、株AR58からの大腸菌中で発現された先の例からのタンパク質、並びにアジュバントとして、任意に油/水エマルジョン中、及び任意にコレステロールと調剤した、3de-O-アシル化モノホスホリル脂質A (3D-MPL) 及び水酸化アルミニウム又は3D-MPL及び/又はQS21の混合物を含む製剤で調剤する。

【0151】

3D-MPLはグラム陽性細菌サルモネラ・ミネソタのリポポリサッカライド(LPS)の化学的に無毒化した形態である。Smith Kline Beecham Biologicalsで行った実験は、種々のビヒクルと組み合わせた3D-MPLが体液性及びTH1型の細胞免疫性の両方を増強する。

QS21は、強力なアジュバント活性を有するキラジャ・サボナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) 樹木の樹皮の粗抽出物から精製された1つのサポニンであり；それは抗原特異的リンパ球増殖及びいくつかの抗原に対するCT

2 Oに希釈し、次にSB62, 3D-MPL (5 µg)、QS21 (5 µg) 及び防腐剤として50 µg/mlのチオメルサルを5分間隔で連続的に加える。エマルジョン容量は全容量の50% (100 µlの投与量のために50 µl) に等しい。全てのインキュベーションは撹拌しながら室温で行った。抗原を含まないアジュバントをタンパク質をPBSで置きかえることにより調剤した。

【0156】

PROT D E7ワクチン抗原での腫瘍退化実験 (HPV16) : 融合タンパク質Prot D E7

プロテインDはグラム陰性細菌ヘモフィルス・インフルエンゼの表面に露出したりボプロテインである。融合パートナーとしてのプロテインDの109の最初の残基の封入物を組み込み、バスタンダーヘルプ特性を有するワクチン抗原を提供する。その抗原を前掲の通りQS21 3D-MPL及びSB62と共に調剤した。

【0157】

実験XIX : 生体内腫瘍退化実験

腫瘍細胞系TC1:

C57BL/6マウスからの一次肺上皮細胞をHPV16E6及びE7により不死化し、次に活性化rasオンコジーンで形質転換してE6及びE7を発現する腫瘍細胞系を作った (Lin KYら、1996)。E7発現は、マウス抗HPV16 E7 Mab (Triton Corp. Alameda, CA) を用いて固定化浸透化TC1のFACS分析により確認されている。

【0158】

腫瘍成長:

試験管内増殖で増殖するTC1細胞をトリプシン処理し、無血清培地で2回、洗い、マウスの右側腹部にS. C. 注入した。確立された腫瘍の治療を評価するために、TC1細胞を3×10<sup>4</sup>細胞/マウスの投与量で注入した。腫瘍注入後1及び2週に、PBSもしくは3D-MPL、QS21及びSB62中の足のprot D1/3 E7 His 100 µl (50 µl/足) 中5 µgで又はPBSもしくはアジュバントのみでワクチン接種した。各々のグループに

Lの両方を活性化する。

【0152】

3D-MPL及びアルムを含む本発明の抗原を含むワクチンは、WO93/19780又は92/16231に記載されるものと同様に調剤することができる。

Smith Kline Beecham Biologicalsで行った実験は、体液性及びTH1型細胞免疫応答の両方の誘導における3D-MPL及びQS21の組合せの明らかな共同効果を証明した。このような抗原を含むワクチンはUS5750110に記載される。

【0153】

油/水エマルジョンは2つの油 (トコフェロール及びスクアレン)、及び乳化剤としてTween 80を含むPBSから構成される。エマルジョンは、5%スクアレン、5%トコフェロール、0.4% Tween 80を含み、180nmの平均粒径を有し、SB62として知られている (WO95/17220を参照のこと)。

【0154】

Smith Kline Beecham Biologicalsで行った実験は、このO/WエマルジョンのMPL/QS21への適用がそれらの免疫刺激特性を更に増加させることを証明した。

エマルジョンSB62 (2倍濃縮物) の調剤

Tween 80をリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) に溶かしてPBS中2%溶液を提供する。100mlの2倍濃縮エマルジョンを提供するために、5gのDLαトコフェロール及び5mlのスクアレンをボルテキシングして全体を混合する。90mlのPBS/Tween溶液を加え、全体を混合する。次に生じたエマルジョンをシリンジに通し、最後にM110Sマイクロフルーディクス機を用いることにより微小液体化する。生じた油滴は約180nmの大きさを有する。

【0155】

Prot. D1/3 E7 QS21/3D MPL水中油製剤の調剤

Prot D1/3-E7 (5 µg) を10倍濃度のPBS pH6.8及びH

5のC57BL/6マウス (Iffa Credo) を用いた。マウスを腫瘍成長について週に2回、モニターした。平均腫瘍量/グループを図26に示す。PBS中prot D1/3 E7 Hisで又はPBSもしくはアジュバントのみでワクチン接種したマウスは次第に成長する腫瘍 (0~1の無腫瘍動物/グループ) を発達させた。反対に、アジュバント中prot D1/3 E7 Hisをワクチン接種した5のマウスのうち4つが腫瘍を発達させず、1匹の動物が極めて小さくかつ安定な腫瘍を40日目に発達させた。この結果は、アジュバント中に調剤したHPV16からのタンパク質prot D1/3 E7 Hisがこの抗原を発現する小さな確立された腫瘍の退化を誘導することができることを示す。

【0159】

免疫学的読出し

増殖アッセイ:

試験管内アッセイのために、69日目に、ワクチン接種したマウスからの脾臓又は腋窩リンパ節を破壊することにより調剤した。

2×10<sup>5</sup>の細胞のアリコートを、ラテックスマイクロビーズ (Sigma) に減少濃度 (10, 1, 0.1 µg/ml) のprot D1/3 E7 Hisをコートし、又はコートしない96ウェルプレート中で3回重複して入れて試験管内で細胞を再評価した (72 Hrs)。T細胞増殖を3Hチミジン組込みにより測定した。

【0160】

図27及び28は、PBS, 3D-MPL, QS21 SB62, Prot D1/3 E7 His及びProt D1/3 E7 His+3D-MPL、QS21, SB62このアジュバントにより生体内で用意した脾細胞及びリンパ節細胞の増殖を刺激するprot D E7の能力を比較し、脾臓内の高い増殖性応答が、他のグループと比較してアジュバント中prot D1/3 E7 Hisで免疫化したマウスでのみ検出されたことを示す。

【0161】

抗体応答

個体の血清をとり、同時に器官をとって、間接的ELISAにかけた。

5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製したE7タンパク質をコート化抗原として用いた。37℃で1時間のPBS+1%新生ウシ血清中の飽和の後、その血清を飽和緩衝液中で(1/100で始めて)連続的に希釈し、4℃でO/Nで、又は37℃で90分、インキュベートした。PBS Tween 20中で洗った後、0.1%のビオチニル化ヤギ抗マウスIg (1/1000)又はヤギ抗マウスIgサブクラス(全部でIgG, IgG1, IgG2a, IgG2b)抗血清(1/5000)を第2抗体として用い、37℃で90分のインキュベーションの後、ペルオキシダーゼに結合させたストレプトアビジンを加え、TMB(テトラメチルベンジジン/ペルオキシド)を基質として用い、10分後、その反応を $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5Mで停止させ、O.D. 450を測定した。

#### [0162]

異なるグループのマウスにおけるワクチン接種により誘発させたサブクラス特異的抗E7タイトルを、血清の相対的平均中点希釈の比較として図29に示す。

これらの結果は、Prot D1/3 E7 HPV16単独の2回の注入により弱い応答が誘発されることを示す。

アジュバントSB62, QS21+3D-MPLの存在下でProt D1/3 E7を注入した場合、かなり多い抗E7抗体が作られる。

#### [0163]

IgAもIgMも、アジュバントSB62, QS21+3D-MPL中のProt D1/3 E7を与えたマウスの血清でさえ、いずれの血清サンプルも検出されなかった。対照的に、全IgGレベルはProt D1/3 E7単独を与えたマウスのワクチン接種により少し増加し、アジュバントSB62, QS21+3D-MPLのタンパク質への添加により大きく増加した。異なるIgGサブクラスの濃度の分析は、抗原又はアジュバントのみを受容させたマウスの血清中で観察された濃度と比べて、アジュバント抗原を受容したマウスの血清において、分析したIgGサブクラスの全ての型(IgG1, IgG2a及びIgG2b)の濃度が増加するにつれ混合された抗体応答が誘導されていることを示す。見いだされた主要な異型は全てのIgGの80%超を示すIgG2bであり、この異型は一般に、TH1型免疫応答の誘導に関連しているといわれる。

図31及び32は、各々、脾細胞又は膝高リンパ節細胞の両方で、治療設定において観察されるように、SB62, QS21, 3D-MPLアジュバント中のE7タンパク質を与えたマウスについてより優れたリンパ球増殖活性が得られたことを示す。

#### 抗体応答

図33は、治療設定と同様に、3D-MPL, QS21 O/Wアジュバント中に調剤したProt D1/3 E7タンパク質でワクチン接種したマウスの血清中でより優れた抗体応答が観察されたことを示す。この場合も、テストした全てのIgGサブクラス(IgG2a, IgG2b, IgG1)において混合された抗体応答が誘発され、IgG2bが全IgGの75%を示す主要な異型であることが見いだされた。

#### [0169]

実施例XI: Prot D1/3 E7 (HPV18)でのワクチン接種実験  
マウスを、PBS又はQS21, 3D-MPL及びSB62, WO96/33739に記載されるDQ MPL又はWO98/15827に記載されるDQアルムMPL中の100  $\mu\text{l}$ のprot D1/3 18 E7 Hisイントラ・フット・パッド(50  $\mu\text{l}$ /フット・パッド)中5  $\mu\text{g}$ で2週間間隔で2回、ワクチン接種した。8匹の6~8週齢Balb/cマウス(Iffa Credo)を各々のグループに用いた。14日後に、免疫学的読出しのために脾臓及びリンパ節をとり、血清学のために血液サンプリングを行った。

#### [0170]

##### ○免疫学的読出し:

##### 増殖アッセイ:

試験管内アッセイのために、ワクチン接種したマウスからの脾臓又は膝窩リンパ節を破壊することによりリンパ球を調製した。

2×10<sup>5</sup>細胞のアリコート、減少濃度(10, 1, 0.1, 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )のprot D1/3 18 E7 Hisで96ウェルプレート内に3回重複して入れてその細胞を試験管内で再刺激した(72時間)。T細胞増殖を<sup>3</sup>Hチミジン組込みにより測定した。結果を、刺激インデックス(cpmサン

#### [0164]

##### 実施例XX: 生体内腫瘍保護実験

マウスを、PBS、実施例1のアジュバント、5  $\mu\text{g}$ のprot D1/3 E7 His又は100  $\mu\text{l}$ の容量中フット・パッド内の実施例1のアジュバント中の5  $\mu\text{g}$ のprot D1/3 E7 Hisのいずれかで14日間隔で2回、免疫化した。

#### [0165]

##### 腫瘍成長:

最も新しいワクチン接種後4週間に、マウスを側腹部において2×10<sup>5</sup> TC1細胞/マウスS.C.で攻撃した。試験管内培養で増殖中のTC1細胞をトリプシン処理し、無血清培地で2回、洗い、注入した。各々のグループに用いた5匹のマウスを腫瘍成長について、1週間に2回、モニターした。

#### [0166]

図30は、SB62, QS21, 3D-MPLアジュバント中のE7タンパク質でのワクチン接種が、腫瘍の成長を進展させた、アジュバントなしのE7タンパク質又はアジュバントのみを受容させた他の全てのグループにおける腫瘍の発達に対してマウスを保護する(5匹のうち1匹だけの動物が極めて小さくかつ安定な腫瘍を有する)ことを示す。

#### [0167]

##### 免疫学的読出し

最も新しいワクチン接種後3週に、腫瘍攻撃前に、各々のグループ内の5のマウスを免疫学的読出しのために殺した。

##### 増殖アッセイ

試験管内アッセイのために、リンパ球を脾臓から及び膝窩リンパ節から上述の通り調製した。2×10<sup>5</sup>のアリコートを、ラテックスマイクロビーズ(Sigma)に減少濃度(10, 1, 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )のprot D1/3 E7 Hisをコートした又はコートしない96ウェルプレート内に3回重複で入れた。

#### [0168]

ブル/cpmベースライン)として表す。

#### [0171]

図34及び35は、Prot D1/3 18 E7 His又はProt D1/3 18 E7 His+アジュバントのいずれかにより生体内でプライムした脾細胞又はリンパ節細胞の増殖を刺激するprot D1/3 18 E7の能力を比較し、タンパク質のみを与えたマウスにおいて基底リンパ球増殖が見られ、対照的にアジュバント中のprot D1/3 18 E7で免疫化したマウスにおいて脾臓において高い増殖応答が、リンパ節において極めて高い応答が検出された。

#### [0172]

##### サイトカイン生産

培地又はProt D1/3 18 E7 (1又は3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を伴う脾臓又はリンパ節の試験管内再刺激の96時間の期間の後、その培養上清中に生産されたサイトカイン(IL-5及びIFN $\gamma$ )を、記載される通りELISAにより測定した:

##### IFN $\gamma$ (Genzyme)

IFN $\gamma$ の定量をGenzymeからの試薬を用いてELISAにより行った。サンプル及び抗体溶液をウェル当り50  $\mu\text{l}$ で用いた。96ウェルマイクロタイタープレート(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)を一晚、4℃で、カーボネート緩衝液pH9.5中1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したハムスター抗マウスIFN $\gamma$  50  $\mu\text{l}$ で4℃で一晩、コートした。次に、プレートを1時間、37℃で、1%ウシ血清アルブミン及び0.1% Tween 20(飽和溶液)を含むPBS 100  $\mu\text{l}$ とインキュベートした。飽和緩衝液中の試験管内刺激(1/2で開始)からの上清の2倍希釈物を抗IFN $\gamma$ -コート化プレートに加え、1時間30分、37℃でインキュベートした。そのプレートをPBS Tween 0.1%(洗浄液)で4回、洗い、最終濃度0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に飽和緩衝液で希釈したビオチンコンジュゲート化ヤギ抗マウスIFN $\gamma$ を各々のウェルに加え、37℃で1時間、インキュベートした。洗浄ステップの後、飽和緩衝液に1/10000で希釈したAMDEXコンジュゲート(Amersham)を37℃で30分、加えた。



プレートを上述の通り洗い、15分、50  $\mu$ lのTMB (Biorad) とインキュベートした。その反応をH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4Nで停止させ、450nmを読んだ。Softmax Pro (4パラメータ等式) により標準曲線 (マウスIFN $\gamma$ 標準) を用いて濃度を計算しpg/mlで表した。

#### [0173]

##### IL5 (Pharmingen)

IL5の定量を、Pharmingenからの試薬を用いてELISAにより行った。サンプル及び抗体溶液をウェル当り50  $\mu$ lで用いた。96ウェルマイクロタイタープレート (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark) を一晩、4℃で、カーボネート緩衝液pH9.5に1  $\mu$ g/mlに希釈した50  $\mu$ lのラット抗マウスIL5でコートした。次にプレートを1時間、37℃で、1%ウシ血清アルブミン及び0.1% Tween 20を含む100  $\mu$ l PBS (飽和緩衝液) とインキュベートした。飽和緩衝液中の試験管内刺激 (1/2で開始) からの上清の2倍希釈物を抗IFN $\gamma$ -コート化プレートに加え、1時間30分、37℃でインキュベートした。そのプレートをPBS Tween 0.1% (洗浄液) で4回、洗い、最終濃度1  $\mu$ g/mlで飽和緩衝液で希釈したビオチンコンジュゲート化ラット抗マウスIL5を各々のウェルに加え、37℃で1時間、インキュベートした。洗浄ステップの後、飽和緩衝液中1/10000に希釈したAMDEXコンジュゲート (Amersham) を30分、37℃で加えた。上述の通りプレートを洗い、15分、50  $\mu$ lのTMB (Biorad) と共にインキュベートした。その反応をH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4Nで停止させ、450nmを読んだ。Softmax Pro (4パラメータ等式) により標準曲線 (相換えマウスIL-5) を用いて濃度を計算し、pg/mlで表した。

#### [0174]

脾臓細胞で始めて、テストしたグループ全てでIL-5は検出できず、対照的に、全てのグループにおいて極めて高い生産量のIFN $\gamma$ 生産が観察され、他のグループと比べて、SBAS1cで補助したタンパク質を与えたマウスのグループにおいて少しだけ増加した。このことは、TH1型の免疫応答の誘導を示唆する。

gG1、48% IgG2a及び43% IgG1、44% IgG2a。最も強力な抗体応答は、アインタイプ濃度の明確なシフトを伴うDQアルムで調剤したタンパク質で得られる。Balb/cマウスにおけるIgG2aアインタイプは一般に、TH1型の免疫応答の誘導に関連していると考えられるので、これらの結果はDQS21、3D-MPL及びSB62 QS21/3D-MPLアジュバントが体液性応答のTH1型プロフィールを増加させる傾向があり、SBAS5は明らかなTH2型の応答を誘導することを示唆する。

#### [0178]

図38は、血清の中点希釈、及び異なるグループにおけるワクチン接種により誘発される異なるアインタイプの相対的割合の比較を示す。

##### 結論:

我々は、融合タンパク質:1/3 Prot D及びHPV16の早期タンパク質E7が潜在的な全身の抗腫瘍免疫性を誘導することを証明し、融合タンパク質:Prot D1/3及びHPV18のE7もマウスにおいて免疫原性を示している。prot D1/3 E7 HPV16融合タンパク質でのワクチン接種は、E7発現性腫瘍細胞での腫瘍攻撃からマウスを保護し、ワクチン接種部位から離れた部位に注入したHPV16のE7を発現する小さな予め確立された腫瘍を排除した。

#### [0179]

我々は、アジュバント中のProt D1/3 E7 HPV16タンパク質がヘルパーT細胞増殖を増強することができることを証明し、このことは、このワクチンにより誘導される抗腫瘍免疫応答がCD4+T細胞応答と少なくとも部分的に関連していることを示唆する。

我々は、3D-MPL含有アジュバントの存在下でのProt D1/3 E7でのワクチン接種によりより優れた抗体応答が誘発されることも証明した。C57BL/6マウスに見い出された主要アインタイプIgG2bはTH1型免疫応答がおこったことを示唆する。

#### [0175]

リンパ節細胞に関して、タンパク質のみを与えたマウスのグループにおいて極めて弱いIFN $\gamma$ 生産が観察され、アジュバントをかえたタンパク質で5~10倍の増加が観察される。IL-5は、SBAS2アジュバント添加タンパク質を与えたマウスのグループにおいてのみIL-5を検出することができた。

図36及び37は、各々脾臓又はリンパ節細胞の試験管内再刺激後のサイトカイン (IFN $\gamma$ 及びIL5) の生産を刺激するProt D1/3 18 E7 Hisの能力を比較する。

#### [0176]

##### 抗体応答

個々の血清を器官と同時に採取し、間接的ELISAにかけた。

2.5  $\mu$ g/mlの精製したprot D1/3 18 E7タンパク質HPV18をコートされた抗原として用いた。37℃で1時間、PBS+1%新生ウシ血清中に飽和した後、その血清を飽和緩衝液で (1/100で始めて) 連続的に希釈し、O/Nで4℃で90分、37℃でインキュベートした。PBS Tween 20で洗った後、ビオチン化ヤギ抗マウスIg (1/1000) 又はヤギ抗マウスIgサブクラス (全部でIgG、IgG1、IgG2a、IgG2b) 抗血清 (1/5000) を二次抗体として用い、37℃で90分のインキュベーションの後、ペルオキシダーゼに結合したストレプトアビジンを加え、TMB (テトラメチルベンジジン/ペルオキシド) を基質として用い、10分後、その反応をH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5Mで停止させ、O.D. 450を測定した。

#### [0177]

Prot D1/3 18 E7単独の2回の注入で極めて弱い抗体応答が誘発される。全体のIgGレベルはアジュバントをタンパク質ワクチンに加えることにより大きく増加した。

異なるIgGサブクラスの濃度の分析は、アジュバント、DQS21、3D-MPL又はSB62、QS21/3D-MPLの存在下でタンパク質を注入した時、IgG2aサブタイプの割合が少し増加したことを示す:非アジュバント添加タンパク質でIgG1 46%、IgG2a 32%と比べて各々28% 1

#### [図1]

##### タンパク質D1/3 E7 his

```
1 MDPSSSHSNM ANTMQMSDKJ IIAHRGASGY LPEHTLESKA LAFAQADYL
51 EQDLAMTKDG RLVIHDFH DGLTDVAKKF PHRHKJGGRY YVIDFLKEI
5 101 QSLEMTENFE TMAMHGDFT LHEYMLDLP ETDDLVCYEQ LNDSEEEDE
151 IDGPAGQAEF DRAHYNVTF CCKCDSTLR CVQSTHYDIR TLEDLMGTL
10 201 GIVPICSSQK PTHGHRRHH *
```

##### Figure 1b

融合タンパク質Prot D1/3 E7-Hisテールを発現するプラスミドの配列 (HPV16からのE7)

```
15 1 ATGGATCCAA GCAGCCATTC ATCAAATATG QCGAATACCC AAATGAAATC
51 AGACAAAATC ATTATTGCTC ACCGTGGTGC TAGCGGTTAT
TTACCAAGGC
101 ATACGTTAGA ATCTAAAGCA CTTCGGTGT CACAACAGGC
TGATTATTTA
20 151 GAGCAAGATT TAGCAATGAC TAAGGATGGT CGTTTAGTGG
TTATTACGGA
201 TCACCTTTTA GATGGCTTGA CTGATGTTCG GAAAAAATTC
CCACATCGTC
251 ATCGTAAAGA TGGCCGTAC TATGTCATCG ACTTTACCTT
22 AAAAGAAATT
301 CAAAGTTTAG AAATGACAGA AAACCTTGAA ACCATGGCCA
TGCATGGAGA
351 TACACCTACA TTGCATGAAT ATATGTTAGA TTTGCAACCA
GAGACAACTG
30 401 ATCTCTACTG TTATGAGCAA TTAATGACA GCTCAGAGGA
GGAGGATGAA
451 ATAGATGGTC CAGCTGGACA AGCAGAAGCG GACAGAGCGC
ATTACAAAT
501 TGTAACTTTT TGTGCAAGT GTGACTCTAC GCTTCGGTGT TGCCTACAAA
35 551 GCACACACGT AGACATTCGT ACTTTGGAAG ACCTGTTAAT
GGGCCACACTA
601 GGAATTGTGT GCCCATCTGT TTCTCAGAAA CCAACTAGTG
```

#### [図1-1]

GCCACCATCA  
651 CCATCAACCAT TAA

Figure 1

【図2】

プラスミド pRIT 14497 (TCA 307) の作製

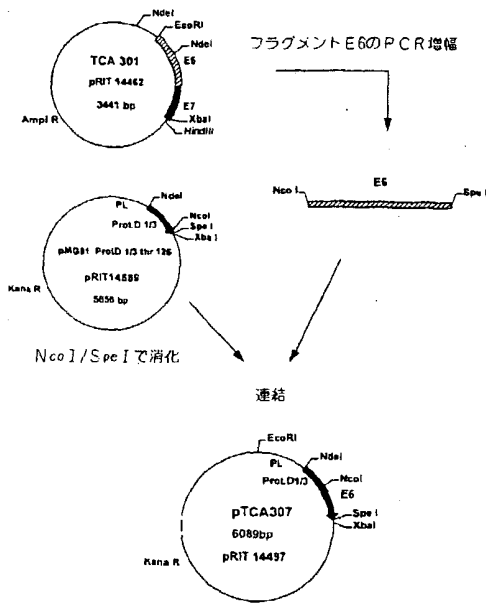


Figure 2

【図3】

PROT. D1/3 E6 His/HPV16 の配列

ヌクレオチド配列

ATGGATCCAAAGCAGCCATTCATCAAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 30  
 AGACAAAATCATTATTGCTCAGCGTGGTGTAGCGGTATTATTACAGAGC 100  
 ATACGTTAGAAATCTAAAGCACTTGGCTTTCACACAGGCTGATTATTTA 150  
 GAGCAAGATTAGCAATGACTAAGGATGGTGTGTTAGTGGTTATTCACGA 200  
 TCACCTTTTATAGATGGCTGACTGATGGTGGCAAAAAATTCACACATCGTC 250  
 ATCGTAAAGATGGCGTTACTATGTCTCGACTTACCTTAAAGAAATTT 300  
 CAAAGTTTGAATAATGACAGAAAACTTTGAAACCAAGCCATGTTTCAGGA 350  
 CCCACAGGACCGACCCAGAAAGTTACCAAGTATGACACAGAGCTGCAAA 400  
 CAACTATACATGATAAATAATTAGAAATGTGTCTGCAAGCAACAGTTA 450  
 CTGGCAGCTGAGGTATATGACTTTTGGCTTTTGGGATTTATGCATAGTATA 500  
 TAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTT 550  
 CTAAAAATTAGTGAATATAGACATTATTTGTTATGTTGTATGGAACACA 600  
 TTGAACAGCAATACAAACAAACCGTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTAT 650  
 TAACTGTCAAAAGCCACTGTGTCTGTGAAGAAAAAGCAAGACATCTGGACA 700  
 AAAAGCAAGATTCCATAATATAAGGGGTGGTGGACCGGTGATGTATG 750  
 TCTTGTGCAGATCAACAAGACACGTAGAGAAACCCAGCTGACTAGTGG 800  
 CCACCATCACCATCACCATTAA 822  
 ペプチド配列  
 MDPSSSSNNMANTOMKSKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQQAADYL 50  
 EQDLAMTKDGLRVVHDFLDGLTDYAKKPFPHURKDRYVVIDFTLKEI 100  
 QSLMENTFETMAMFQDPQPRKLPQLCTELQTTIHDIILECYCKQQL 150  
 LRREYVDFAPRDLICIVYRDGNPYAVCDKCLKFYKISEYRHYCYSLYGT 200  
 LEQQYNKPLCDLIRCTNCQKPLCPEEKQRHLKQRFHNRGRWTGRCM 250  
 SCCRSSRTRRETQLTSGHHHHHHH 274

Figure 3

【図4】

プラスミド pRIT 14556 (TCA 309) の作製

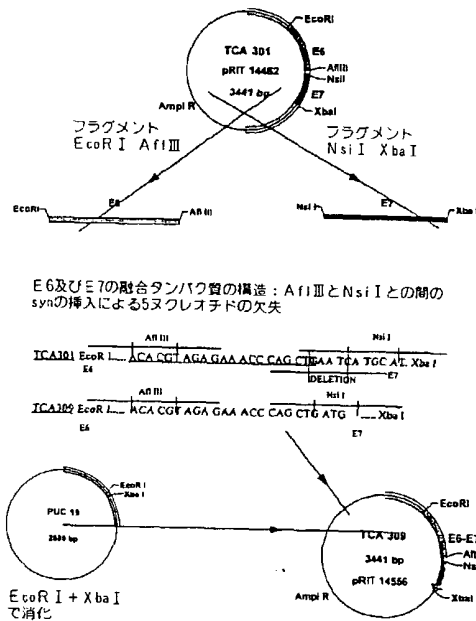


Figure 4

【図5】

プラスミド pRIT 14512 (TCA 311) の作製

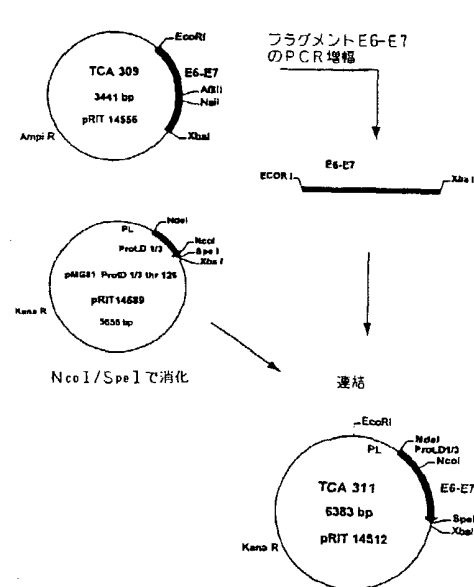


Figure 5



【図10】



Figure 10

【図11】

## プラスミド pRIT 14626 (TCA330) の作製

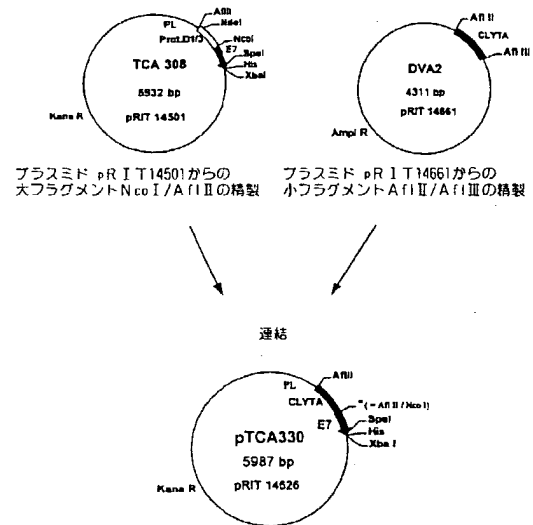


Figure 11

【図12】



Figure 12

【図13】

## プラスミド pRIT 14634 (TCA331) の作製

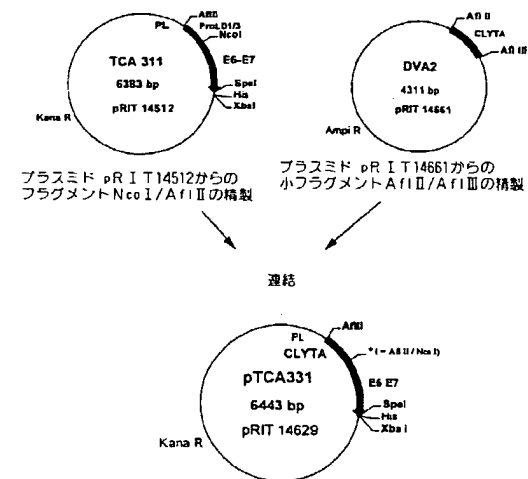


Figure 13

【図14】

## CLYTA-E6E7-His.の配列

ヌクレオチド配列

ATGAAAGGGGAATTGTACATTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTT 50  
 TGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTTCAGGCTATATGC 100  
 TTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGCGCACTGGTACTGGTTGCAC 150  
 AACTCAGCGGAAATGGCTACAGGCTGGAAAGAAAATCGCTGATAAOTGGTA 200  
 CTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGCGTGGGTCAAGTACAAGG 250  
 ACACCTTGGTACTACTTACGCTAAAGAGAGCGGCCATGGTATCAAAATGCC 300  
 TTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACAGACGG 350  
 AACACTGGCAGACAGGCCAGAAATGGCCAGCATGCTGGACATGGCCATGT 400  
 TTCAGGACCCACAGGAGCGAGCCAGAAAGTTACACAGTTATGCACAGAG 450  
 CTGCAAAACAATAATACATGATATAATATTAGAAATGTGTACTGCAAGCA 500  
 ACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTTGGGATTTATGCA 550  
 TAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAG 600  
 TTTTATTCTAAATAGTGAGTATAGACATTATGTTATAGTTTGTATGG 650  
 AACAACTTAGAACAGCAATACAAACAAACCGTTGTGTGATTGTTAATTA 700  
 GGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGCTGAAGAAAAGCAAGACAT 750  
 CTGGACAAAAGCAAGATTCCATAATATAAGGGTCCGTGGACCGGTGCG 800  
 ATGTATGCTTGTGAGATCATCAAGAACAGTAGAGAAACCCAGCTGA 850  
 TGCATGGAGATACACTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCA 900  
 GAGACAACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGA 950  
 GGAGGATGAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCCGACAGAGCCC 1000  
 ATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTGT 1050  
 TGGCTACAAAGCACACAGTAGACATTCGTACTTGGAAAGACCTGTTAAT 1100  
 GGGCACACTAGGAATTGTGGCCCATCTGTTCTCAGAAACCAACTAGTG 1150  
 GCCACCATCAACATCACTATAA 1173

ペプチド配列

MKGGIVHSDGSPYKDKFEKINGTWYFYDSSGYMLADRWKHTDGNWYWF 50  
 NSGEMATGWKXIADKWYFYNEEGAMKGTWVKYKDTWYVLDKEGAMVSNA 100  
 FIQSADGTGWYLYKPDGTLADRELAASMLDMAMFQDPQERPKLPQLCTE 150  
 LQTHIHMLECVYKQQLRREYVDFAFRDLICVYRDGNFYAVCDKCLK 200  
 FYKISEYRHYCYSLYGTLEQQYNKPLCDLLIRCNCQKPLCEKQRH 250

【図14-1】

LDKKQRFHNRGRWTRGCMSCRSRTRKETQLAHGDTPTLHEVMDLQ 300  
 ETDLYCYEQINDSSEEDBDGPAQAEPRAHYNITVFCCKDSTLRL 350  
 CVQSTHVDIRTELLMGTGLGVFHCQKPTSGHGHGH 391

Figure 14

【図15】

## PLASMID pRIT 14532 (TCA 316) の作製

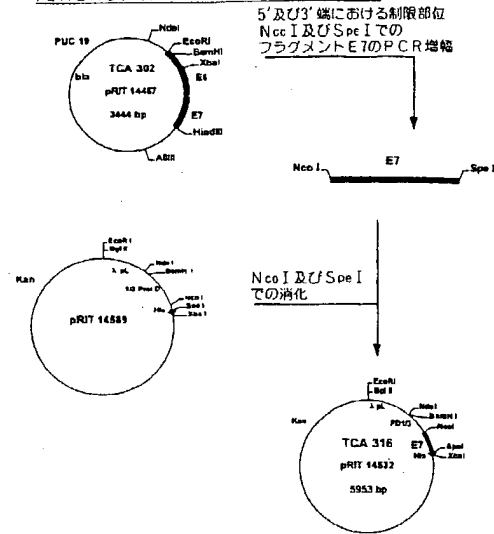


Figure 15

【図16】

## PROT.D1/3-E7-H1S/HPV18の配列

ヌクレオチド配列

ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50  
 AGACAAAATCATTATTGCTACCCGTGGTCTAGCGGTTATTTACCAGAGC 100  
 ATACGTTAGAACTAAAGCACTTGCCTTTGCAACAAGGCTGATTATTTA 150  
 GAGCAAGATTAGCAATGACTAAGGATGGTCTTTAGTGGTTATTCACGA 200  
 TCACTTTTATAGTGGCTTGAAGTATGTTGCGAAAAAATCCACATCGTC 250  
 ATCGTAAAGATGGCGCTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAAGAAAT 300  
 CAAAGTTTAAAGATGACAGAAAACTTTGAAACCATGGCCATGCATGGACC 350  
 TAAAGCAACATTGCAAGACATTGTATGCAATTAGAGCCCAAAATGAAA 400  
 TTCCGGTTGACCTTCTATGTACGAGCAATTAAGGACTCAGAGGAAGAA 450  
 AACGATGAAATAGATGAAGTTAATCATCAACATTACAGCCGACGAGC 500  
 CGAACCACAAACGTCACAAATGTTGTATGTTGTAAAGTGTGAAGCCA 550  
 GAATTGAGCTAGTAGTAAAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCCAG 600  
 CAGCTGTTTCTGAAACACCTGTCTTTGTGTGCTCGTGGTGTGCATCCCA 650  
 GCAGACTAGTGGCCACCATCACCATTAA 684

ペプチド配列

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKA 40  
 LAFQAQADYLEQDLAMTKDGRIVVIHDFLDGLTDVAKKF 80  
 PHRHRKDGRIYVIDFLKEIQSLEMTENFETMAMHGPAT 120  
 LQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEENDEIDEVNHQ 160  
 HLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARJELVVESSADDLRAFQ 200  
 QLFLNTLSFVCPWCASQQTSGHHHHHH 228

Figure 16

【図17】

## PLASMID pRIT 14523 (TCA 313) の作製

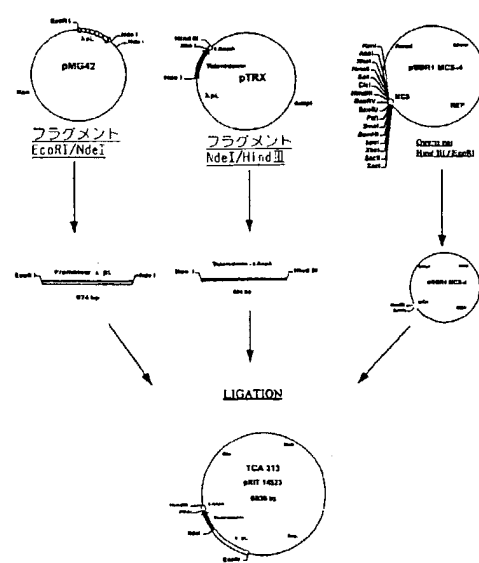


Figure 17

【図18】

## チオレドキシンの配列

5  
MSDKIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIA 40  
PILDEIADEYQGLTVAKLNDQNPGTAPKYGIRGIPTLL 80  
LFKNGEVAATKVGAISKGLKEFLDANLA 110

10

Figure 18

【図19】

## プラスミド pRIT 14831 の作製

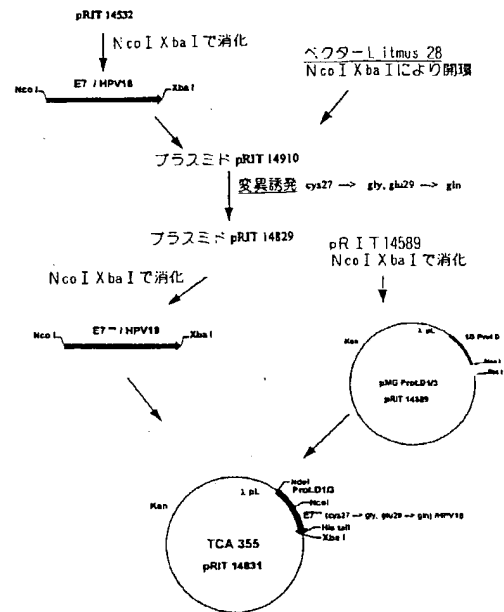


Figure 19

【図20】

## PROT.D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→gln)HPV18.の配列

ヌクレオチド配列:

ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAAATATGGCAATACCCAAATGAAATC 50  
AGACAAAATCATTTATGCTCACCGGTGGTCTAGCGGTTATTTACGAGAGC 100  
ATACGTTAGAACTAAAGCACTTGCCTTTGCACACAGGCTGATTATTTA 150  
GAGCAAGATTATGCAATGACTAAGGATGGCTGTTACTGTTATTCACGA 200  
TCACCTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAATCCACATCGTC 250  
ATCGTAAAGATGGCCCTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAAGAAAT 300  
CAAAAGTTTAGAAATGACAGAAAATTTGAAACCATGCGCATGCGACCC 350  
TAAGGCAACATTGCAAGACATTTGATTCATTTAGAGCCCCAAATGAAA 400  
TTCCGGTTGACCTTCATGCTCACCAGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGAA 450  
AACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACATTTACGACCCGACGAGC 500  
CGAACCAACCTCACACAATGTTGTGTATGTTGTGAAGTGTGAAGCCA 550  
GAATTGAGCTAGTAGTAGAAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATCCAG 600  
CAGCTGTTCTGAACACCCCTGCTCTTTGTGTGTCGGTGGTGTGCATCCCA 650  
GCAGACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA 684

変異: T418 → C

G424 → C

20 ペプチド配列:

MDPSSHSNMANTOMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50  
EQDLAMTKDGRVVIHDFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYVVIDFTLKEI 100  
QSLEMTENFETMAMHGPATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLGHQQLSDSEE 150  
NDEIDGVNHQHLPARJAEPORHMLCMCKCEARJELVVESSADDLRAFO 200  
QLFLNTLSFVPCWCAQQTSGHHHHHH 228

変異したアミノ酸: cys27→gly (=C27→G), glu29→gln (=E29→Q) of E7  
は融合タンパク質の残基140及び142である。

N term M D P -ProtD1/3(aa4 → 111)-M A-mutated E7(aa 114 → 218)-TSGHHHHHH  
Cterm.

30

Figure 20

【図21】

## プラスミド pRIT 14526 (TCA314) の作製

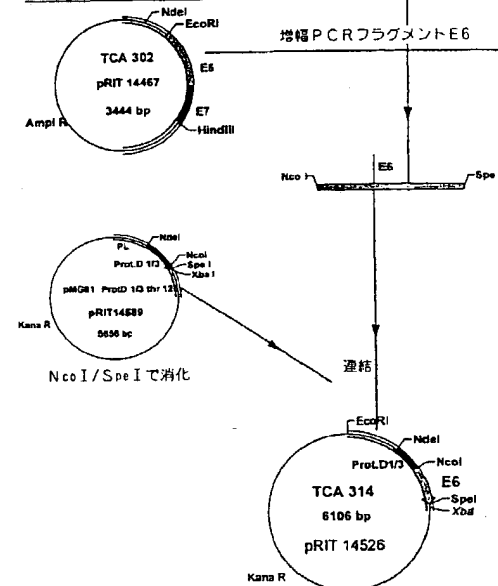


Figure 21



【図25-1】

SCCNKARQERLQRRRETQVMHGPATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQL 300  
 SDSEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESAD 350  
 DLRAFOQLFLNTLSFVCPWCAQQTSQBHHHLL 384

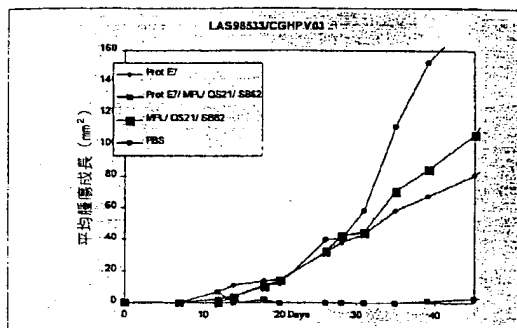
Figure 25

【図26】

Figure n° 26

HPV16のProtD1/3 E7製剤でのワクチン接種の、T C1腫瘍  
 成長への治療効果

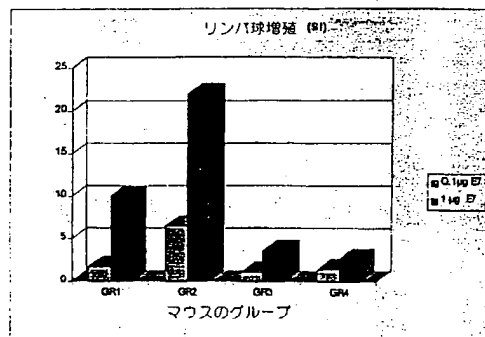
10



【図27】

Group 2: ProtD 1/3 E7 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL  
 Group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL  
 Group 4: PBS

15



【図28】

Figure N° 28

リンパ節細胞でのリンパ球増殖  
 (刺激指数)

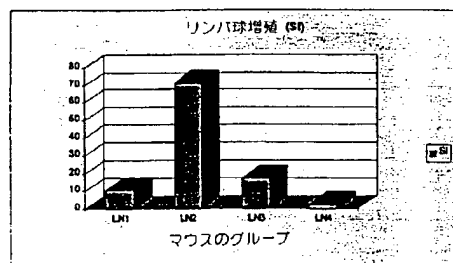
ProtD1/3 E7での72時間の試験管内再刺激 (1 μg/ml)  
 (exp 96533)

Group 1: ProtD 1/3 E7

Group 2: ProtD 1/3 E7 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Group 4: PBS



【図29】

Figure n° 29

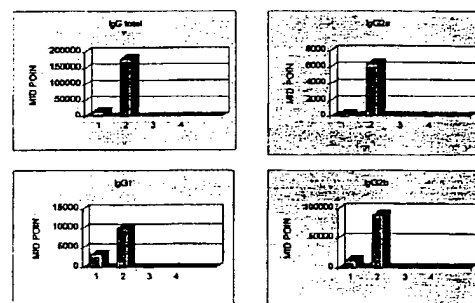
サブクラス特異的抗体応答 (exp 96533)

group 1: ProtD1/3 E7 HPV16

group 2: ProtD1/3 E7 HPV16 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL

group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL

group 4: PBS

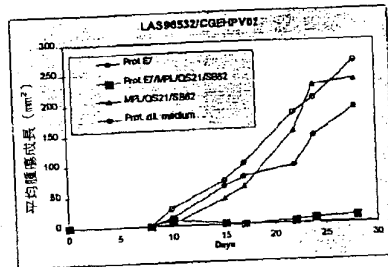




【図30】

Figure n°30

TCT1腫瘍攻撃に対するProtD1/3 E7 HPV16製剤でのワクチン接種の保護効果

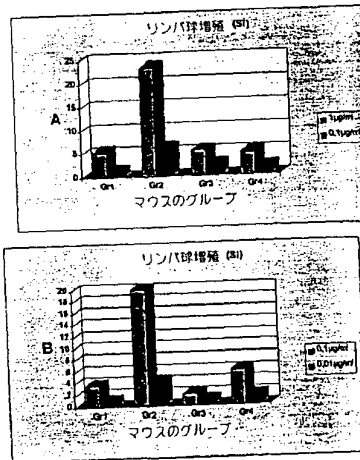


【図31】

Figure n°31

脾臓細胞でのリンパ球増殖 (刺激示数) (E vs. 96532)

- 5 A) ProtD1/3 E7 (1; 0.1 µg/ml)  
 B) ProtD1/3 E7 (0.1; 0.01 µg/ml) (ラテックスマイクロビーズコート)  
 で72時間の再刺激  
 Group 1: ProtD1/3 E7 HPV16  
 Group 2: ProtD1/3 E7 HPV16 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL  
 Group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL  
 Group 4: PBS

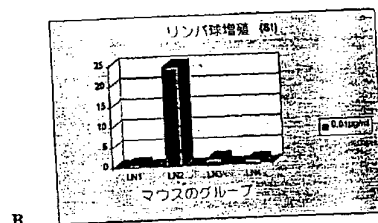
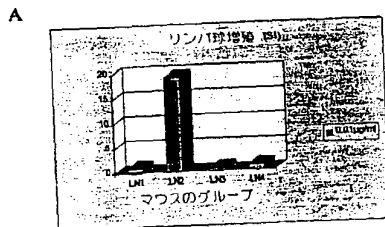


【図32】

Figure n°32

リンパ節細胞でのリンパ球増殖 (刺激示数) (E vs. 96532) で72時間の試験管内再刺激

- 10 A) ProtD1/3 E7 (0.01 µg/ml)  
 B) ProtD1/3 E7 (0.01 µg/ml) (ラテックスマイクロビーズコート)  
 Group 1: ProtD1/3 E7 HPV16  
 Group 2: ProtD1/3 E7 HPV16 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL  
 Group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL  
 Group 4: PBS

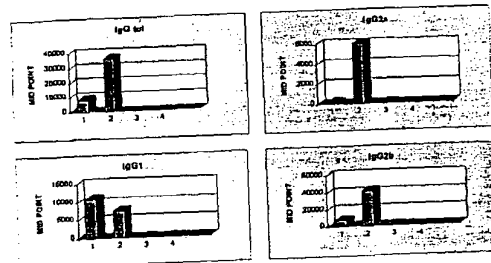


【図33】

Figure n°33

サブクラス特異的抗体応答 (E vs 96532)

- 5 group 1: ProtD1/3 E7 HPV16  
 group 2: ProtD1/3 E7 HPV16 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL  
 group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL  
 group 4: PBS



【図34】

Figure n° 34

脾臓細胞でのリンパ球増殖 (刺激示数)

PD1/3 18E7での72時間の試験管内再刺激 (10, 1, 0.1, 0.01 µg/ml)  
(Exp 98038)

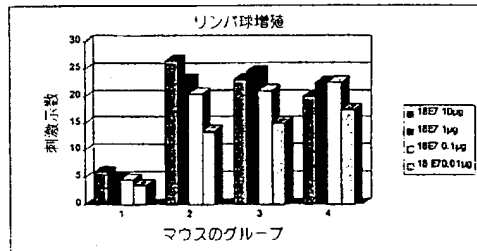
Group 1: ProtD 1/3 18 E7

Group 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 + 3D-MPL

Group 3: ProtD 1/3 18 E7 + QS21 + 3D-MPL + SB62 O/W

Group 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 アルム

脾臓 Gr	1	2	3	4
18E7 10µg	6	27	23	20
18E7 1µg	5	23	25	23
18E7 0.1µg	5	21	21	23
18 E70.01µg	4	14	15	18
ベースライン/cpm	1168	1359	1025	1268



【図35】

Figure n° 35

膝窩リンパ節でのリンパ球増殖

PD1/3 18E7での72時間の試験管内再刺激 (10, 1, 0.1, 0.01 µg/ml)  
(Exp 98038)

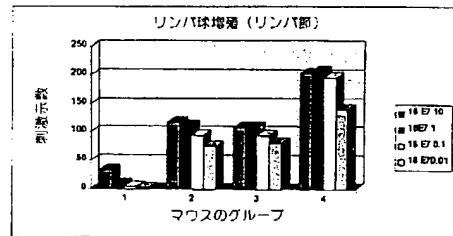
Group 1: ProtD 1/3 18 E7

Group 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 + 3D-MPL

Group 3: ProtD 1/3 18 E7 + QS21 + 3D-MPL + SB62 O/W

Group 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 アルム

LN Group	1	2	3	4
18 E7 10	33	117	108	203
18E7 1	8	110	108	208
18 E7 0.1	4	95	95	196
18 E70.01	2	75	81	141
ベースライン	325	161	131	607



【図36】

Figure n° 36

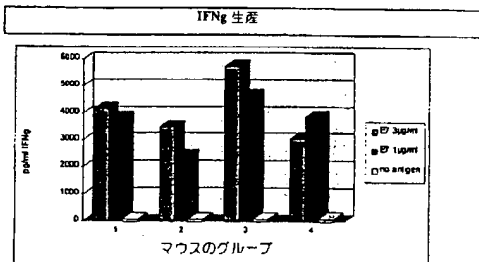
試験管内再刺激で96時間後の脾臓細胞の増殖上清におけるサイトカイン生産 (ProtD 1/3 18E7 1.3 µg/ml)

Group 1: ProtD 1/3 18 E7

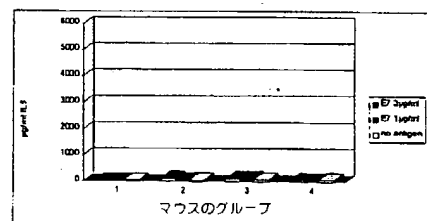
Group 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQ 3D-MPL

Group 3: ProtD 1/3 18 E7 + QS21, 3D-MPL, SB62 O/W

Group 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQ, 3D-MPL アルム



IL5 生産



【図37】

Figure n° 37

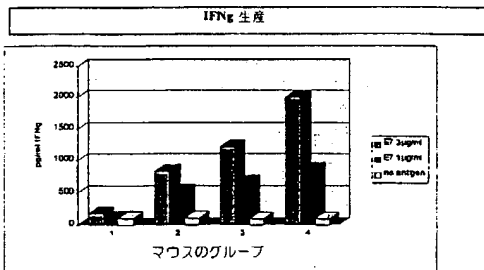
ProtD 1/3 18E7での96時間の試験管内再刺激後のリンパ節細胞の増殖上清におけるサイトカイン生産

Group 1: ProtD 1/3 18 E7

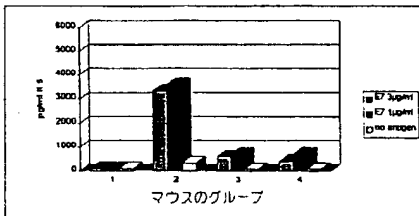
Group 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 3DMPL +

Group 3: ProtD 1/3 18 E7 + SB62 QS21/3DMPL

Group 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQ アルム



IL5 生産



【図38】

Figure n° 38

抗体応答及びアイソタイプ (exp 98038)

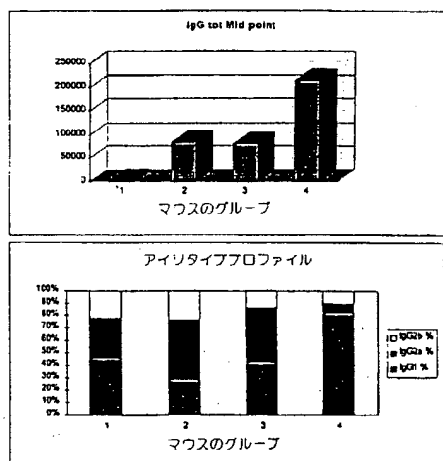
Group 1: ProtD 1/3 18 E7

Group 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 3DMPL

Group 3: ProtD 1/3 18 E7 + SB62 QS21/3DMPL

Group 4: ProtD 1/3 18 E7 + MPL DQ アルム

Groups	mid. Dil	IgG1 tot	IgG1 %	IgG2a %	IgG2b %
1	1500	46	32	22	
2	84172	28	48	23	
3	80545	43	44	13	
4	213685	82	8	10	



【請求項11】 更なるHPV抗原を含む請求項7～10のいずれかに記載のワクチン。

【請求項12】 医薬に用いるための請求項7～11のいずれかに記載のワクチン。

【請求項13】 HPVにより誘導される良性又は悪性の腫瘍を患う被検体を免疫療法により治療するためのワクチンの製造のための請求項7～11のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項14】 HPVウイルス感染を予防するためのワクチンの製造のための請求項7～11のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項15】 請求項6に記載のDNA配列を含むベクター。

【請求項16】 請求項6に記載のDNA配列と、チオレドキシンをコードするDNA配列と、を含むベクター。

【請求項17】 請求項6に記載のDNA配列で形質転換された宿主。

【請求項18】 請求項15又は16に記載のベクターで形質転換された宿主。

【請求項19】 チオレドキシンをコードするDNA配列で更に形質転換された請求項17に記載の宿主。

【請求項20】 請求項1～4のいずれかに記載のタンパク質を生産するための方法であって、宿主細胞を請求項6に記載のDNA配列で形質転換し、該配列を発現させ、そして要求される産物を単離することを含む方法。

【請求項21】 請求項7～11のいずれかに記載のワクチンを生産するための方法であって、請求項1～5のいずれかに記載のタンパク質を、適切なアジュバント、希釈剤又は他の医薬として許容される賦形剤と混合することを含む方法。

【手続補正書】 特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】 平成12年2月22日 (2000. 2. 22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヘモフィルス・インフルエンザBからのプロテインD又はその誘導体に連結した、E6、E7及びE6/E7融合タンパク質からなる群から選択されるヒトパピローマウイルス抗原を含む融合タンパク質。

【請求項2】 前記E6又はE7タンパク質がHPV16又はHPV18から得られることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 前記E7タンパク質が網膜芽腫遺伝子産物についての結合を減少させるよう変異されていることを特徴とする請求項1又は2に記載のタンパク質。

【請求項4】 E6のp53領域に変異が導入されていることを特徴とする請求項1又は2に記載のタンパク質。

【請求項5】 少なくとも4ヒスチジン残基のヒスチジンタグを更に含む請求項1～4のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA配列。

【請求項7】 請求項1～5のいずれかに記載のタンパク質と、医薬として許容される希釈剤又は賦形剤と、を含むワクチン。

【請求項8】 アジュバントを更に含む請求項7に記載のワクチン。

【請求項9】 前記タンパク質が水性エマルジョンビヒクル中の油内に供されることを特徴とする請求項7又は8に記載のワクチン。

【請求項10】 前記アジュバントが、3D-MPLもしくはQS21又はそれら両方を含むことを特徴とする請求項8又は9に記載のワクチン。

【手続補正書】

【提出日】 平成12年12月21日 (2000. 12. 21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 請求項9

【補正方法】 変更

【補正内容】

【請求項9】 前記タンパク質が水中油エマルジョンビヒクル中に供されることを特徴とする請求項7又は8に記載のワクチン。

【手続補正2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0022

【補正方法】 変更

【補正内容】

【0022】

好ましくは、本発明のタンパク質は、トランス (T-I-T) でチオレドキシンと同時に発現される。トランス対シスのチオレドキシンの同時発現が、プロテアーゼを必要とすることなく、チオレドキシンを含まない抗原を維持するために好ましい。チオレドキシン同時発現は、本発明のタンパク質の可溶性を容易にする。チオレドキシン同時発現は、タンパク質精製収率、精製されたタンパク質の溶解度及び質に大きな影響を与える。

【手続補正3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0037

【補正方法】 変更

【補正内容】

【0037】

プラスミドTCA308 (=pRIT14501) の作製: 融合タンパク質-D1/3-E7-Hisを発現するプラスミド

E7のアミノ酸1→98に相当するヌクレオチド配列をpRIT14462から増幅する。そのポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE7配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG MCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA308(=pRIT14501)を供した。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に改変が形成されていないことを確認した。その融合タンパク質-D1/3-E7-His(HPV16)についての配列を図1に記載する。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正内容】

【0065】

キャラクターゼーション:

タンパク質D1/3 E6 Hisは次の通りキャラクタライズする。

タンパク質D1/3-E6-HisはプロテインD部分からの112アミノ酸を伴う273アミノ酸長ペプチドである。タンパク質D1/3-E6-Hisは32kDの理論分子量を有し、SDS-PAGEで33kDタンパク質として移動する。タンパク質D1/3-E6-Hisの理論等電点は8.17である。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正内容】

【0080】

実施例VIII:融合Prot D1/3-E7変異(cys24→gly, glu26→gin)型HPV16を発現する大腸菌株B1002の作製

## 1) 発現プラスミドの作製

出発材料:

011)

トランスのチオレドキシンと共に発現されるタンパク質D1/3 E7 His HPV(大腸菌B1012)

## 1) 発現プラスミドの作製

1) a. 融合タンパク質-D1/3-E7-His/HPV18を発現するプラスミドであるプラスミドTCA316(=pRIT14532)の作製

出発材料

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3(=pRIT14589)はインフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4~81がヘモフィルス・インフルエンゼ株772、バイオタイプ2(H.Jansonら、1991, Infection and Immunity, Jan. p119-125)の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に相当するコドンにより置換されている(WO97/01640として公開されたUK特許出願n°9513261.9に記載される)pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域(6His)がある(図15を参照)。このプラスミドを融合タンパク質D1/3-E7-Hisを発現させるのに用いる。

## 【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

【補正方法】変更

【補正内容】

【0116】

TCA316(=pRIT14532)の作製

E7のアミノ酸1→105に相当するヌクレオチド配列をpRIT14467から増幅した。そのポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE7配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG MCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA316(=pRIT14532)を供した。その挿入物を配列決定して改変対E7/HPV18原型配列を

a) 融合Prot D1/3-E7-HisをコードするプラスミドpRIT14501(=TCA308)

b) クローニングベクターpUC由来のプラスミドLITMUS28(New England Biolabs cat n°306~28)

c) ヘモフィルス・インフルエンゼ株772、バイオタイプ2(H.Jansonら、1991, Infection and Immunity, Jan. p.119~125)の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に対応するコドンにより、インフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4~81が置換されているpMG81(上述)の誘導体であるプラスミドpMG MCS Prot D1/3(pRIT14589)、Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域(6His)がある。

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0113

【補正方法】変更

【補正内容】

【0113】

ペレット画分中にある約4.8kDaの主要バンドをクーマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗cIyta抗体により、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したNierNTAコンジュゲート(Qiagen cat. n°34510)によりウエスタン・ブロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約1%を示す。

## 【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0114

【補正方法】変更

【補正内容】

【0114】

実施例XIII: Prot D1/3 E7 His(HPV18)(大腸菌B1

、グルタミン酸によるグリシンの置換(E7中のaa43、融合タンパク質中の位置156)を作り出すE7遺伝子(ヌクレオチド128G→A)中で同定した。その融合タンパク質-D1/3-E7-His/HPV18についての配列を図16に記載する。

## 【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0133

【補正方法】変更

【補正内容】

【0133】

E7遺伝子中の変異の導入をキット“Quick Change Site directed Mutagenesis(Stratagene cat n°200518)で実現した。pRIT14532はHPV18の原型配列におけるグリシンのかわりにE7の位置43におけるグルタミン酸の存在を示したので、位置43にグリシンを導入するために変異誘発の第2サイクルを行った。我々は、プラスミドpRIT14829(=TCA353)を得た。配列決定により完全なE7遺伝子の変異及び組込みの存在を確認した後、その変異したE7の遺伝子をベクターpRIT14589(=pMG MCS Prot D1/3)に導入してプラスミドpRIT14831(=TCA355)を供した(図19を参照)。

## 【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0134

【補正方法】変更

【補正内容】

【0134】

融合タンパク質-D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→gin)-Hisについての配列は図20に記載される。

2) Prot D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→gin)-His/HPV18を発現する株B1098の作製

プラスミドpRIT14831を、 $\lambda$  pLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失 $\lambda$ リソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985、Proc Natl. Acad. Sci. 82: 88) に導入し、カナマイシンに耐性である形質転換体についての選択により株B1098を供した。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0177

【補正方法】変更

【補正内容】

【0177】

Prot D1/3 18 E7単独の2回の注入で極めて弱い抗体応答が誘発される。全体のIgGレベルはアジュバントをタンパク質ワクチンに加えることにより大きく増加した。

異なるIgGサブクラスの濃度の分析は、アジュバント、DQS21、3D-MPL又はSB62、QS21/3D-MPLの存在下でタンパク質を注入した時、IgG2aサブタイプの割合が少し増加したことを示す：非アジュバント添加タンパク質でIgG1 46%、IgG2a 32%と比べて各々28% IgG1、48% IgG2a及び43% IgG1、44% IgG2a。最も強力な抗体応答は、アインタイプ濃度の明確なシフトを伴うDQアルムで調製したタンパク質で得られる。(80% IgG1、8% IgG2a) Balb/cマウスにおけるIgG2aアインタイプは一般に、TH1型の免疫応答の誘導に関連していると考えられるので、これらの結果はDQS21、3D-MPL及びSB62 QS21/3D-MPLアジュバントが体液性応答のTH1型プロファイルを増加させる傾向があり、SBAS5は明らかなTH2型の応答を誘導することを示唆する。

【手続補正12】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】

PROT.D1/3 E6 His/HPV16の配列

ヌクレオチド配列

```
ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATTGCTCACCCTGGTCTAGCGGTTATTTACCAGAGC 100
ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCCTTTGCACACAGGCTGATTATTTA 150
GAGCAAGATTTAAGCAATGACTAAGGATGGCTGTTTACTGCTTATTCACGA 200
TCACITTTTAGATGGCTTACTGATGTTGCGAAAAAATCCACATCGTC 250
ATCGTAAAGATGGCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAGAAAT 300
CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACTTTGAAACCATGGCCATGTTTCAGGA 350
CCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACACAGTTATGCACAGAGCTGCAAA 400
CAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGCAAGCAACAGTTA 450
CTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCAATAGTATA 500
TAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATT 550
CTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACA 600
TTAGAACAGCAATACAAACAAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTAT 650
TAACTGTCAAAAGCCACTGTGCTCTGAAGAAAAAGCAAGACATCTGGACA 700
AAAAGCAAGATTCCATAATATAAGGGGTGCGTGGAACCGTTCGATGTATG 750
TCTTGTGCAGATCATCAAGAACCGTAGAGAAACCCAGCTGACTAGTGG 800
CCACCATCACCATCACCATTAA 822
```

ペプチド配列

```
MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50
EQDLAMTKDGRVLVVDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEI 100
QSLMENTENFETMAMFQDPQERPKLPQLCTELQTHIHDIIECVYCKQQL 150
LRREVYDFAFRDLGIVYRDGNPYAVCDKCLKFYKSEYRHYCYSLYGT 200
LEQYQNKPLCDLLIRINCQKPLCEEKQRHLDKKQRFHNRGRWTRGCM 250
SCCRSSRTRETQLTSGHHHHH. 273
```

Figure 3

【手続補正14】

【補正対象書類名】図面

【補正内容】

【図1】

タンパク質D1/3 E7 his

```
1 MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL
51 EQDLAMTKDGRVLVVDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEI
101 QSLMENTENFETMAMHGDTPPTLHEYMLDLQPEETDLYCYEQNLNDSSEED
151 IDGPAGQAEPRDAHYNIIVTFCKCDSLTLLCVQSTHVDIRTLEDDLMGTL
201 GIVCPICQKPTSGHHHHH*220
```

Figure 1b

融合タンパク質PreD1/3-E7-Hisテールを発現するプラスミドの配列 (HPV16からのE7)

```
1 ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC
51 AGACAAAATCATTATTGCTCACCCTGGTCTAGCGGTTATTTACCAGAGC
TTACCAGAGC
101 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCCTTTGCACACAGGCTGATTATTTA
TGATTATTTA
151 GAGCAAGATTTAAGCAATGACTAAGGATGGCTGTTTACTGCTTATTCACGA
TTATTACGA
201 TCACTTTTAGATGGCTTACTGATGTTGCGAAAAAATCCACATCGTC
CCACATCGTC
251 ATCGTAAAGATGGCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAGAAAT
AAAAGAAAT
301 CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACTTTGAAACCATGGCCATGTTTCAGGA
TGATGGAGA
351 TACACATGCTCAAGCACTTGCCTTTGCACACAGGCTGATTATTTA
GAGCAACCTG
401 ATCTCTACTGTTATGAGCAA TTAATGACGA GCTCAGAGGA
GGAGGATGAA
451 ATAGATGGCTCAGCTGGACA AGCAGAACCCGACAGAGGCC
ATTACAATAT
501 TGTAACTTTTGTGTGCAAGTGTGACTCTAC OCTTCGGTTT TCGGTACAAA
551 GCACACACGTAGACATTCGT ACTTTGGAAG ACCTGTTAAT
GGGCACTACTA
601 GGAATTTGTGTGCCCATCTGT TCTCAGAAA CCAACTAGTG
GCCACCATCA
651 CCATCACCATTAA 663
```

Figure 1

【手続補正13】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図3

【補正対象項目名】図6

【補正方法】変更

【補正内容】

【図6】

PROT.D1/3-E6-E7-His/HPV16の配列

ペプチド配列

```
ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATTGCTCACCCTGGTCTAGCGGTTATTTACCAGAGC 100
ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCCTTTGCACACAGGCTGATTATTTA 150
GAGCAAGATTTAAGCAATGACTAAGGATGGCTGTTTACTGCTTATTCACGA 200
TCACITTTTAGATGGCTTACTGATGTTGCGAAAAAATCCACATCGTC 250
ATCGTAAAGATGGCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAGAAAT 300
CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACTTTGAAACCATGGCCATGTTTCAGGA 350
CCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACACAGTTATGCACAGAGCTGCAAA 400
CAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTACTGCAAGCAACAGTTA 450
CTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCAATAGTATA 500
TAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATT 550
CTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACA 600
TTAGAACAGCAATACAAACAAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTAT 650
TAACTGTCAAAAGCCACTGTGCTCTGAAGAAAAAGCAAGACATCTGGACA 700
AAAAGCAAGATTCCATAATATAAGGGGTGCGTGGAACCGTTCGATGTATG 750
TCTTGTGCAGATCATCAAGAACCGTAGAGAAACCCAGCTGACTAGTGG 800
AGATACACCTACATTGATGATGATATATGTTAGATTGCAACCAAGAGACAA 850
CTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGAT 900
GAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTAACA 950
TATTGTAACTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTTCGTTGTGCTGCTAC 1000
AAAGCACACAGTAGACATTCGTAATTTGGAAGACCGTTAATGGGCACA 1050
CTAGGAATGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCAACTAGTGCCCAACA 1100
TCACCATCACCATTAA 1116
```

ペプチド配列

```
MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50
EQDLAMTKDGRVLVVDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEI 100
QSLMENTENFETMAMFQDPQERPKLPQLCTELQTHIHDIIECVYCKQQL 150
LRREVYDFAFRDLGIVYRDGNPYAVCDKCLKFYKSEYRHYCYSLYGT 200
LEQYQNKPLCDLLIRINCQKPLCEEKQRHLDKKQRFHNRGRWTRGCM 250
SCCRSSRTRETQLMHGDTPTLHEYMLDLQPEETDLYCYEQNLNDSSEED 300
EIDGPAGQAEPRDAHYNIIVTFCKCDSLTLLCVQSTHVDIRTLEDDLMGTL 350
LGIVCPICQKPTSGHHHHH. 371
```

Figure 6

【手続補正15】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 8

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 8】

PROT.D1/3-E7 変異 (cys24→gly, glu26→gln) HPV16の配列

ヌクレオチド配列:

ATGGATCCAAAGCAGCCATTCATCAAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50  
 AGACAAAATCATTATGCTCACCGTGGTGTAGCGGTTATTACCAAGAGC 100  
 ATACGTTAGAACTTAAAGCACTTGGCTTTGCAACAAGGCTGATTATTTA 150  
 GAGCAAGATTAGCAATGACTAAGGATGGTGTAGTGTGTTATTCACGA 200  
 TCACTTTTAGATGGCTTGAATGATGTTGGCAAAAAATTCACCATCGTC 250  
 ATCGTAAAGATGGCGTTACTATGTCATCGACTTACCTTAAAGAAAT 300  
 CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAATTTGAAACCATGGCCATGCAATGGAGA 350  
 TACACCTACATTGCAATGAATATGTTAGATTGCAACCAAGAGACAAC 400  
 ATCTCTACGGTTATCAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGATGAA 450  
 ATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATACAATAT 500  
 TGTAACTTTTGTGCAATGTTGACTCTACGCTTGGTGTGCGTACAAA 550  
 GCACACAGTACAGCATCTGACTTTGGAAGACCTGTTAATGGCACACTA 600  
 GGAATTTGTGCGCCCATCTGTTCTCAGAAACCAACTAGTGGCCACCATCA 650  
 CCATCACCATTAA 663

変異: T409 → G

G415 → C

ペプチド配列:

MDPSSHSNMANTQMSDKJIIHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50  
 EQDLAMTKDGRLYVINHDGLDGLTVDAKXFPKRRKDKGRYYVIDFTLKEI 100  
 QSLMENTENFETMAMHGDPTTLEHMLDQPEETDLYGYQLNDSSEEEDE 150  
 IDGPAGQAEPRAHYNIIVTFCKCDSTLRICVQSTHYDIRTLEDLLMGTL 200  
 GIVCPICSQKPTSGHHHHHH 220

変異したアミノ酸: cys24→gly(= C24→G), glu26→gln(= E26→Q) of  
 E7は融合タンパク質の残基137及び139である

N term: MDP-ProD1/3(aa4 → 111)-M-A-mutated E7(aa114 → 211)-

TSGHHHHHH Cterm.

Figure 8

【手続補正 17】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 12

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 12】

CLYTA-E7-His.の配列

ヌクレオチド配列

ATGAAAGGGGAAATGTACATTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAAGTT 50  
 TGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTACAGTTTACGGCTATATGC 100  
 TTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGAC 150  
 AACTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGTA 200  
 CTATTTCAACGAAAGAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGTCAAGTACAAGG 250  
 ACACCTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAAGCGGCAATGTTATCAAAATGCC 300  
 TTTATCCAGTCAGCGGACGGCAACGGCTGGTACTACCTCAAACCAAGACGG 350  
 AACACTGGCAGACAGGCCAGAAATGGCCAGCATGCTGGACATGGCCATGC 400  
 ATGGAGATACACCTACATTGCAATATATGTTAGATTGCAACCAAGAG 450  
 ACAACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGA 500  
 GGATGAAATAGATGGTCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCAT 550  
 ACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGC 600  
 GTACAAAGCACACACGTAGACATTGCTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGG 650  
 CACACTAGGAATTGTTGTCGCCCATCTGTTCTCAGAAACCAACTAGTGGCC 700  
 ACCATCACCATCACCATTAA 720

ペプチド配列

MKGIVHSDGSYPKDKFEKINGTWYFYDSSGYMLADRWKHTDGNWYWF 50  
 NSGEMATGWKKIADKWWYFNEEGAMKGTWVKYKDTWYVYLDKEGAMVSN 100  
 FQSADGTGWYVYLPDGLADRPFLASMLDMAMHGDPTTLEHMLDQPE 150  
 TTDLYCYEQLNDSSEEDIDGPAGQAEPRAHYNIIVTFCKCDSTLRIC 200  
 VQSTHYDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPTSGHHHHHH 235

Figure 12

【手続補正 18】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 13

【補正方法】変更

【手続補正 16】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 10

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 10】

CLYTA-E6-Hisの配列

ヌクレオチド配列

ATGAAAGGGGAAATGTACATTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAAGTT 50  
 TGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTTACGGCTATATGC 100  
 TTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGAC 150  
 AACTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGTA 200  
 CTATTTCAACGAAAGAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGTCAAGTACAAGG 250  
 ACACCTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAAGCGGCAATGTTATCAAAATGCC 300  
 TTTATCCAGTCAGCGGACGGCAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAAGACGG 350  
 AACACTGGCAGACAGGCCAGAAATGGCCAGCATGCTGGACATGGCCATGT 400  
 TTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCAAGTATGCACAGAG 450  
 CTGCAAAACACTATACATGATATAATATTAGAAATGTTGTTACTGCAAGCA 500  
 ACAGTTACTGGCAGCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTGGGATTTATGCA 550  
 TAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTTGATAAATGTTAAAG 600  
 TTTTATTTTAAATATAGTATATAGACATTTATGTTATAGTTTGTATGG 650  
 AACCAACTATGAACAGCAATACAAACAAACCGTTGTGTGATTGTTAATTA 700  
 GGTGTATTAACTGTCAAAAGCCACTGTGCTCTGAAGAAAAGCAAGACAT 750  
 CTGGCAAAAAGCAAGATTCCATATATAGGAGTGGTGGTGGACCGGTCG 800  
 ATGTATGTTCTGTGTCAGATCATCAAGAACAGTAGAGAAACCAAGCTGA 850  
 CTAGTGGCCACCATCACCATCAACCATTA 879

ペプチド配列

MKGIVHSDGSYPKDKFEKINGTWYFYDSSGYMLADRWKHTDGNWYWF 50  
 NSGEMATGWKKIADKWWYFNEEGAMKGTWVKYKDTWYVYLDKEGAMVSN 100  
 FQSADGTGWYVYLPDGLADRPFLASMLDMAMHGDPTTLEHMLDQPE 150  
 LQTTIHDIILECYVCKQOLLREYVDFRDLICIVYRDGNPYAVCDCLK 200  
 FYSKISEYRHYCYSLYGTTLLEQQYNKPLCDLIRNCNQKPLCPKQHR 250  
 LDKKQRFHNRGRWTRCSCSSSRTRRQLTSGHHHHHH 292

Figure 10

【補正内容】

【図 13】

プラスミド pRIT 14629 (TCA331) の作製

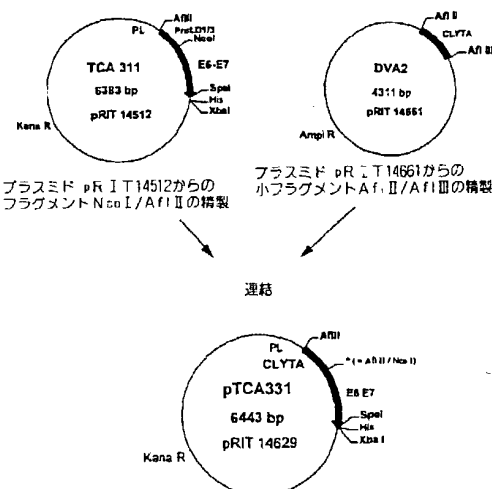


Figure 13

【手続補正 19】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 14

【補正方法】変更

## 【補正内容】

## 【図14】

## CLYTA-E6E7-His.の配列

## ヌクレオチド配列

ATGAAAGGGGAAATTGTACATTAGAGCGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTT 50  
 TGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTTCAGGCTATATGC 100  
 TTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCACTGGTACTGGTTGCGAC 150  
 AAATTGAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAGAAATGCTGATAAGTGGTA 200  
 CTATTTCAACGAAGAAAGTGCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGG 250  
 ACACCTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAAGGCGGCTATGATCAATGCC 300  
 TTTATCCAGTCAAGCGGAGCAAGGCTGGTACTACCTCAAAACAGACGG 350  
 AACACTGGCAGACAGGCGGCAAAATTGGCCAGGCTCTGGACATGGCCATGT 400  
 TTCAGGAGCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACACAGTATGCAACAGAG 450  
 CTGCAAAACACTATACATGATATAATATTAGAAATGTGTGTACTGCAAGCA 500  
 ACAGTTACTGGCAGCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCA 550  
 TAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGATGTGATAAATGTTTAAAG 600  
 TTTTATTTCTAAATTTAGTGAGTATAGACATTTATGTTTATGTTGATGG 650  
 AACAACTTAGAAGCAGCAATACAAACACCTGTGTGTGTTGTTAATTA 700  
 GGTGTATTAACCTGCAAAAGCCACTGTGCTGAAGAAAGCAAGACAT 750  
 CTGGACAAAAGCAAGATTCATAATATAAGGGTCTGGTGGACCGTGG 800  
 ATGTATGCTTGTGCGAGATCATCAAGAACAGGTAGAGAAACCCAGCTGA 850  
 TGCATGGAGATACACCTACATTCATGAATATATGTTAGATTGCAACCA 900  
 GAGCAACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGA 950  
 GGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGACAAAGCAAGCCGACAGAGCCC 1000  
 ATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTG 1050  
 TCGGTACAAAGCACACAGTAGACATTCGACTTTGGAAGACCTGTTAAT 1100  
 GGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCTCTGTTCTCAGAAACCACTAGTG 1150  
 GCCACCATCACCATTACCAATTA 1173

## ペプチド配列

MKGGIVHSDGYPKDKFEKJNGTWYFSSGYMLADRWKHTDGNWYWF 50  
 NSGEMATGWKJADK WYFNEEGAMKTGWVKYKDTWYVLDAGEGAMVSN 100  
 FIQSADGTGWYLYKPDGLADRPFLASMLDMAMFQDPERPRKLPLQCTE 150  
 LQTTINDIIECVYCKQLLRREYDFAPRLDVIYRDGNFYAVCDKCLK 200  
 FYSKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYKPLCDLLJRCINCQKPLCEEKQRH 250  
 LDKKQRFHHRGRWTRCMSSSRTRKETQLMBIGDPTTLHEVYMLDLP 300  
 EFTDLYCYEQINDSSEEDIDGPAQQAEPDRAHYNYVTFCKCDSTLR 350  
 CVQSTHYDIRTLEDLLMGLTGVPCSKPSTSGHHHHHH 390

Figure 14

## 【手続補正20】

## 【補正対象書類名】図面

## 【補正内容】

## 【図18】

## チオレドキシンの配列

MSDKJHLTDDSFDTDLVLDKADGAILVDFWAEWCGPCKMLA 40  
 PILDEIADEYQKLTVALNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLL 80  
 LFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA 109

Figure 18

## 【手続補正22】

## 【補正対象書類名】図面

## 【補正対象項目名】図20

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

## 【補正対象項目名】図16

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

## 【図16】

## PROT.D1/3-E7-HIS/HPV18の配列

## ヌクレオチド配列

ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50  
 AGACAAAATCATTATTGCTCACCGTGGTCTAGCGGTTATTACCAGAGC 100  
 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGGCTTTGCACAAACAGGCTGATTATTA 150  
 GAGCAAGATTAGCAATGACTAAGGATGGTCTTTAGTGGTTATTCACGA 200  
 TCACCTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGGGAAAAAATCCACATCGTC 250  
 ATCGTAAAGATGGCGGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAAGAAAT 300  
 CAAAGTTAGAAATGACAGAAAACTTTGAAACCATGGCCATGCATGGACC 350  
 TAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCAATTAGAGCCCCAAAATGAAA 400  
 TTCCGGTTGACCTTCTATGTCACGAGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGAA 450  
 AACGATGAAATAGATGAAGTTAATCAATCAACATTTACAGCCCCGACGAGC 500  
 CGAACCAACAACCTCACACAATGTTGTGTATGTTGTAAGTGTGAADCCA 550  
 GAATTGAGCTAGTAGTAAAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATCCAG 600  
 CAGCTGTTTCTGAACACCTGTCTTTGTGTGTCCTGGTGTGCATCCCA 650  
 GCAGACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA 684

## ペプチド配列

MDPSSSHSNMANTQMKSDKJIIAHRGASGYLPEHTLESKA 40  
 LAFAQQADYLEQDLAMTKDGRVVIHDFLDGLTDVAKKF 80  
 FHRHRKDGRYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMAMHGPAT 120  
 LQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEENDEIDEVNHQ 160  
 HLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARJELVVESSADDLRAFQ 200  
 QLFNLTLFVCPWCASQTSQHGHGH 227

Figure 16

## 【手続補正21】

## 【補正対象書類名】図面

## 【補正対象項目名】図18

## 【補正方法】変更

## 【図20】

## PROT.D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→gln)HPV18.の配列

## ヌクレオチド配列:

ATUGATCCAAGCAGCCATTTCATCAAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50  
 AGACAAAATCATTATTGCTCACCGTGGTCTAGCGGTTATTACCAGAGC 100  
 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGGCTTTGCACAAACAGGCTGATTATTA 150  
 GAGCAAGATTAGCAATGACTAAGGATGGTCTTTAGTGGTTATTCACGA 200  
 TCACCTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGGGAAAAAATCCACATCGTC 250  
 ATCGTAAAGATGGCGGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAAGAAAT 300  
 CAAAGTTAGAAATGACAGAAAACTTTGAAACCATGGCCATGCATGGACC 350  
 TAAGGCAACATTGCAAGACATTGTAATTGCAATTAGAGCCCCAAAATGAAA 400  
 TTCCGGTTGACCTTCTAGGTACACGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGAA 450  
 AACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACATTTACAGCCCCGACGAGC 500  
 CGAACCAACAACCTCACACAATGTTGTGTATGTTGTGTAAGTGTGAAGCCA 550  
 GAATTGAGCTAGTAGTAAAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCAG 600  
 CAGCTGTTTCTGAACACCTGTCTTTGTGTGTCCTGGTGTGCATUCCA 650  
 GCAGACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA 684

変異: T418→G

G424→C

## ペプチド配列:

MDPSSSHSNMANTQMKSDKJIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50  
 EQDLAMTKDGRVVIHDFLDGLTDVAKKFFHRHRKDGRYVIDFTLKEI 100  
 QSLEMTENFETMAMHGPATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLGHQQLSDSEEE 150  
 NDEIDGVNHQHLFARRAEPQRHTMLCMCKCEARJELVVESSADDLRAFQ 200  
 QLFNLTLFVCPWCASQTSQHGHGH 227

変異したアミノ酸:cys27→gly(=C27→G), glu29→gln(=E29→Q) of E7  
 は融合タンパク質の残基140及び142である。

N term MDP-ProD1/3(aa4→111)-M A-mutated E7(aa114→218)-TSGHHHHHH  
 Cterm.

Figure 20

## 【手続補正23】

## 【補正対象書類名】図面

## 【補正対象項目名】図22

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【図22】

## PROT.D1/3-E6-His/HPV18.の配列

## ヌクレオチド配列

ATGGATCCAAAGCAGCCATTTCATCAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50  
 AGACAAAATCATTATTGCTCACCCTGGTGTAGCGGTATTACAGAGC 100  
 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGGCTTGGCACAACAGGCTGATTATTA 150  
 GAGCAAGATTAGCAATGACTAAGGATGGTCTGTTAGTGGTTATTCACGA 200  
 TCACTTTTAGATGGCTGACTGATGTTGGCAAAAAATCCACATCGTC 250  
 ATCGTAAAGATGGCGTTACTATGTCATCGACTTACCTTAAAAAGAAAT 300  
 CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACCTTTGAAACCATGGCGCGCTTGAGGA 350  
 TCCAAACACGCGACCTTACAAGCTACCTGATCTGTGCACGGAACGAACA 400  
 CTTCACTGCAAGACATAGAAAACCTGTGTATATTGCAAGACAGATTG 450  
 GAACCTACAGAGGTATTGAAATTTGCAATTAAGATTATTTGTGGTGA 500  
 TAGAGACAGTATACCGCATGTCATGCCATAAATGTATAGATTTTATT 550  
 CTAGAATTAGAGAATTAAGACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACA 600  
 TTGGAATAAATAAATAAGTGCCT 650  
 GCGGTGCCAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAACTTAGACACCTTAATG 700  
 AAAAAACGACGATTTCACACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCAT 750  
 TCGTGTGCAACCGAGCAGCAGGAAACGACTCCAACGACGACAGAGAAAC 800  
 ACAAGTAACTAGTGCCACCATCACCATTAA 837

## ペプチド配列

MDPSSSHSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50  
 EQDLAMTKDGRLLVINDHFLDGLTDVAKKFPHRJBJDGRYYVIDFTLKEI 100  
 QSLEMTENFETMARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVL 150  
 ELTEVFFAFKDLFVYVYRDSIPHAACHKCIDFYSRJRELRYHSDSVYGD 200  
 LEKLNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLHNEKRRFHNIAQHRYRGQCH 250  
 SCCNRARQERLQRRRETQVTSQHSHHHH 278

Figure 22

【手続補正24】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図25

【補正方法】変更

【補正内容】

【図25】

## PROT.D1/3-E6-E7-His/HPV18.の配列

## ヌクレオチド配列

ATGGATCCAAAGCAGCCATTTCATCAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50  
 AGACAAAATCATTATTGCTCACCCTGGTGTAGCGGTATTACAGAGC 100  
 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGGCTTGGCACAACAGGCTGATTATTA 150  
 GAGCAAGATTAGCAATGACTAAGGATGGTCTGTTAGTGGTTATTCACGA 200  
 TCACTTTTAGATGGCTTGAATGTTGGCAAAAAATCCACATCGTC 250  
 ATGCTAAAGATGGCGTTACTATGTCATCGACTTACCTTAAAAAGAAAT 300  
 CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACCTTTGAAACCATGGCGCGCTTGAGGA 350  
 TCCAAACACGCGACCTTACAAGCTACCTGATCTGTGCACGGAACGAACA 400  
 CTTCACTGCAAGACATAGAAAACCTGTGTATATTGCAAGACAGATTG 450  
 GAACCTACAGAGGTATTGAAATTTGCAATTAAGATTATTTGTGGTGA 500  
 TAGAGACAGTATACCGCATGTCATGCCATAAATGTATAGATTTTATT 550  
 CTAGAATTAGAGAATTAAGACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACA 600  
 TTGGAATAAATAAATAAGTGCCT 650  
 GCGGTGCCAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAACTTAGACACCTTAATG 700  
 AAAAAACGACGATTTCACACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCAT 750  
 TCGTGTGCAACCGAGCAGCAGGAAACGACTCCAACGACGACAGAGAAAC 800  
 ACAAGTAACTAGTGCCACCATCACCATTAA 837  
 TAGAGCCCAAAATGAAATCCCGTTGACCTTCTATGTCAGAGCAATTA 900  
 AGCGACTCAGAGGAAGAAAACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACA 950  
 TTTACCAAGCCGACGAGCGCAACCAACGTCACACAAATGTTGTGTATG 1000  
 GTGTGAAGTGTGAAGCCAGAAATGAGTAGTAGTAGAGAAAGCTCAGCAGAC 1050  
 GACCTTCGAGCATCCAGCAGCTGTTCTGAACACCTCTGCTTTGTGTG 1100  
 TCGTGTGTGTCATCCAGCAGACTAGTGCCACCATCACCATTACCATT 1150

AA 1152

## ペプチド配列

MDPSSSHSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50  
 EQDLAMTKDGRLLVINDHFLDGLTDVAKKFPHRJBJDGRYYVIDFTLKEI 100  
 QSLEMTENFETMARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVL 150  
 ELTEVFFAFKDLFVYVYRDSIPHAACHKCIDFYSRJRELRYHSDSVYGD 200  
 LEKLNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLHNEKRRFHNIAQHRYRGQCH 250  
 SCCNRARQERLQRRRETQVTHGFKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQL 300  
 SDSSEENDEIDGVNHQHLFARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSAD 350  
 DLRAFQQLFNLTLFVCPWCASQOTSCHBDBH 383

Figure 25



## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード(参考)
A 6 1 P	35/00	A 6 1 P	37/00
	37/00		
C 0 7 K	14/025	C 0 7 K	14/025
	19/00		19/00
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N	1/15
	1/19		1/19
	1/21		1/21
	5/10	C 1 2 P	21/02
C 1 2 P	21/02	C 1 2 N	15/00
			5/00
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW		
(72) 発明者	カベゾン シルバ, テレサ ベルギー国, ベー1330 リクサンサール, リュ ドゥ ランスティテュ 89, スミス クライン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム		
(72) 発明者	デリッス, アンヌーマリー, エバ フェル ナンド ベルギー国, ベー1330 リクサンサール, リュ ドゥ ランスティテュ 89, スミス クライン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム		
(72) 発明者	ジェラルル, カトリーヌ マリー ギスレ ーヌ ベルギー国, ベー1330 リクサンサール, リュ ドゥ ランスティテュ 89, スミス クライン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム		

(72)発明者 ロンバードーベンチェク、アンジェラ  
 ベルギー国、ベール330 リクサンサール、  
 リュ ドウ ランスティテュ 89、スミス  
 クライン ビーチャム バイオロジカルズ  
 ソシエテ アノニム

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA32 BA80  
 CA07 DA06 EA04 FA02 GA11  
 GA19 GA25 HA03  
 4B064 AG01 AG32 CA02 CA19 CC01  
 CC06 CC24 CE02 CE03 CE04  
 CE06 CE08 CE10 CE11 CE12  
 DA01 DA05 DA13 DA14  
 4B065 AA01Y AA26X AA41Y AA49Y  
 AA95Y AB01 AC14 AC20  
 BA02 BC03 BC50 BD01 BD14  
 BD15 BD16 BD17 BD18 CA24  
 CA45  
 4C076 AA17 CC18 CC27 DD08 DD30  
 DD34 DD59 DD63 DD70 FF04  
 FF13  
 4C085 AA38 BA55 CC07 DD62 EE06  
 FF12 FF14 FF18 FF19  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41  
 CA01 CA11 DA86 EA28 EA31  
 FA74 GA01 GA10 GA15 GA20  
 GA23 GA26 GA31

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.  
PCT/EP 98/05285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/62 C07K14/025 C07K16/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 456 197 A (BEHRINGWERKE AG) 13 November 1991  see abstract see page 2, line 1-23 see page 2, line 25 - page 3, line 4 see claims	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
X	WO 96 26277 A (CANTAB PHARMA RES ;WHITTLE NIGEL RICHARD (GB); CARMICHAEL JEREMY P) 29 August 1996  see abstract see page 4, line 5 - page 15, line 34 see examples	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 April 1999

Date of making of the international search report

16/04/1999

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentian 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. Application No.

PCT/EP 98/05285

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 05248 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 2 April 1992  see abstract see page 7, line 5 - page 9, line 21 see examples ---	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
X	DE 44 41 197 C (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 28 March 1996  see the whole document ---	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
X	WO 93 22338 A (UNIV LEIDEN) 11 November 1993  see the whole document ---	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
X	FR 2 586 428 A (PASTEUR INSTITUT) 27 February 1987  see abstract ---	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
A	EP 0 386 734 A (BEHRINGWERKE AG) 12 September 1990  see the whole document ---	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
A	WO 96 36702 A (SCHERING CORP) 21 November 1996 -----	7

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05285

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Remark: although claim 7 shares no hierarchical dependence from any of the claims of the invention and although its formulations, relating to a heterologous protein fused to a c-LYTA tag and a histidine tag, is far beyond the scope of the present invention, a search has been carried out limitedly to the disclosures of the claims and examples, whereas the heterologous protein is an E6 or E7 from HPV-16 or HPV-18 (see Art.6 PCT and PCT Search Guidelines III.3.7).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 98/05285

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0456197 A	13-11-1991	DE 4015044 A	14-11-1991
		AU 650648 B	30-06-1994
		AU 7621291 A	14-11-1991
		CA 2042236 A	11-11-1991
		JP 4227000 A	17-08-1992
		PT 97621 A,B	31-03-1992
		US 5753233 A	19-05-1998
WO 9626277 A	29-08-1996	AU 4727296 A	11-09-1996
		CA 2211995 A	29-08-1996
		EP 0812358 A	17-12-1997
		JP 11501804 T	16-02-1999
WO 9205248 A	02-04-1992	AU 8762991 A	15-04-1992
		CN 1067382 A	30-12-1992
DE 4441197 C	28-03-1996	WO 9616181 A	30-05-1996
		EP 0792368 A	03-09-1997
		JP 10508754 T	02-09-1998
WO 9322338 A	11-11-1993	AU 675794 B	20-02-1997
		AU 4358693 A	29-11-1993
		AU 7197096 A	06-02-1997
		CA 2112798 A	11-11-1993
		EP 0593754 A	27-04-1994
		JP 7503975 T	27-04-1995
		NZ 253330 A	25-06-1996
		ZA 9303135 A	02-02-1994
FR 2586428 A	27-02-1987	AT 70280 T	15-12-1991
		CA 1279276 A	22-01-1991
		DE 3682893 A	23-01-1992
		DK 208987 A	26-06-1987
		EP 0235187 A	09-09-1987
		WO 8701375 A	12-03-1987
		GR 862201 A	23-12-1986
		JP 2818745 B	30-10-1998
		JP 8308597 A	26-11-1996
		JP 11023577 A	29-01-1999
		JP 10114677 A	06-05-1998
		JP 2755574 B	20-05-1998
		JP 63500662 T	10-03-1988
		PT 83255 B	31-07-1989
EP 0386734 A	12-09-1990	DE 3907721 A	20-09-1990
		AT 128144 T	15-10-1995
		AU 624485 B	11-06-1992
		AU 5110490 A	13-09-1990
		CA 2011878 A	10-09-1990
		DE 59009669 D	26-10-1995
		DK 386734 T	05-02-1996
		ES 2078255 T	16-12-1995
		IE 67798 B	01-05-1996
		JP 2289600 A	29-11-1990
		PT 93393 A,B	07-11-1990
		US 5547846 A	20-08-1996
WO 9636702 A	21-11-1996	US 5843752 A	01-12-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

page 1 of 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.  
PCT/EP 98/05285

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9636702 A		AU 5729196 A	29-11-1996
		CA 2220575 A	21-11-1996
		EP 0826038 A	04-03-1998
		JP 10507933 T	04-08-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

page 2 of 2